

Charité, Experimentelle Rheumatologie

Regulation und funktionelle Rolle des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 in T- Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Diplom Biologin Jennifer Sandra Silvia Freyer geb. Bohnen

geb. 07.01.1979 in Herne/Westphalen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan: Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Alf Hamman
 2. Prof. Dr. Jochen hühn
 3. PD Dr. Susanne Hartmann

Eingereicht am 15.04.08

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2008

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle und Regulation des murinen Transkriptionsfaktor Foxp3 untersucht. Der erste wesentliche Teil zur Analyse der funktionellen Rolle war dabei die Erzeugung einer BAC- transgenen Maus. Hierfür wurde ein Zielgenvektor mit der kodierenden Region des eYFPs und einer dualen Selektionskassette sowie die Methode des ET- Klonierens verwendet. Leider war die homologe Rekombination des Zielgenvektors in den BAC nicht erfolgreich. Es kam zu einer ungeklärten Rekombination mit Fremd- DNS. Die Erzeugung der transgenen Maus wurde nach diesem Ergebnis eingestellt, und es wurde mit einer von unserem Kooperationspartner zur Verfügung gestellten BAC- transgenen Maus weitergearbeitet. Diese Maus, die DEREK- Maus, wurde nach dem gleichen Prinzip erstellt, wie die in dieser Arbeit gestartete transgene Maus, an Stelle des eYFPs trägt die DEREK- Maus die kodierende Region des GFPs und des Diphtheria- Toxin- Rezeptors. Mit dieser Maus wurden erste Analysen zur Überprüfung der transgenen Maus unternommen. Es wurde die Koexpression von GFP und Foxp3, sowie die Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen mittels Diphtheria- Toxin analysiert.

Als nächstes wurde die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 analysiert. Als einer der ersten Schritte wurde die Stabilität von Foxp3 *in vivo* überprüft und gezeigt, dass T- Zellen, die das Foxp3- Protein exprimieren, bis zu 14 Tage *in vivo* stabil sind. Weiterhin wurde die Stabilität der Foxp3- Expression in *in vitro* Kulturen nach Induktion durch TGF-beta untersucht. Die induzierten Tregs zeigten keine stabile Foxp3- Expression und auch bei der Methylierungsanalyse der TSDR zeigten diese T- Zellen nicht das für *ex vivo* isolierte Foxp3⁺ T- Zellen beschriebene Methylierungsmuster. Die Stabilität scheint mit der Demethylierung der TSDR zu korrelieren. Die induzierten Tregs zeigten neben dem nicht stabilen Foxp3- Phänotyp auch eine von der Foxp3- Expression abhängige Suppression von naiven Zellen im *in vitro* Proliferations- Test.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Struktur und Regulation des Transkriptionsfaktors Foxp3 untersucht. Der Locus wurde auf konservierte Regionen im Vergleich zu den Spezies Maus, Mensch, Ratte, Huhn, Schimpanse, Hund und Frosch untersucht. Die in Floess*, Freyer* *et al.* [1] gefundenen Region TSDR enthält einen hochkonservierten Bereich. Die Region wurde auf mögliche Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen hin analysiert, und ebenfalls wurden in diesem Bereich Histon- Modifikationen für die Acetylierung der Histone H3 und H4, sowie Tri- Methylierung des Lysin4 des Histons H3 gefunden. Die TSDR wurde in Luciferase- Tests auf ihre transkriptionelle Aktivität hin getestet und zeigte einem Enhancer ähnliche unterstützende Aktivität. Die Methylierung der TSDR in den Luciferase- Tests führte zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität. Deletionsmutanten der TSDR konnten den Bereich für die transkriptionelle Aktivität weiter einschränken und zeigten ein 275pb großes Fragment auf, in welchem viele interessante, mögliche Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen und auch die größte Anzahl der differentiell methylierten CpG- Motive liegen

Schlagwörter: Transkriptionsfaktor Foxp3; regulatorische T- Zellen; TSDR = Treg specific demethylated region; Epigenetische Kontrolle

Abstract

The aim of the study was to analyze the function and regulation of the transcription factor Foxp3. In a first step we designed a BAC-transgenic mouse with eYFP under the control of the Foxp3 promoter. For creating these mice we use the ET- cloning method. The step of homologous recombination of the target vector into the BAC failed. Because of that, we decided to work in cooperation with the group of Tim Sparwasser from Munich and their BAC- transgenic mouse called DEREg- mouse. This mouse expresses the coding region of eGFP fused to the diphtheria- toxin- receptor under the control of the Foxp3 promoter. Therefore Foxp3⁺ T cells can be easily detected by eGFP expression and can even be depleted by diphtheria- toxin- application. We confirmed the co- expression of Foxp3 and eGFP and furthermore tested the functionality of the depletion- process of Foxp3⁺ T cells by treatment with diphtheria- toxin.

In a second study, we analyzed the stability of Foxp3 expressing cells *in vivo*. Therefore we transferred Foxp3⁺ T cells in syngenic mice and analyzed these cells after 14 days for their Foxp3- expression. Furthermore, we tested the induction of Foxp3 expression through TGF-beta and the suppressive activity of these cells. We also analyzed those cells for their methylation pattern, comparing cells, which showed an induction of Foxp3- expression after one week of culture with TGF-beta to cells, which received TGF-beta for one week and were then restimulated in the absence of TGF-beta. The stability of Foxp3 expression seems to correlate with the demethylated state of the TSDR (Treg Specific Demethylated Region).

To get a closer look on the region called TSDR in the murine *foxp3* locus, we decided to analyze this region under different aspects. First, we checked for putative binding sites of transcription factors by database analysis of the TSDR. We also analysed histon modifications, such as acetylation of histon H3 and H4 and tri- methylation of lysine 4 at histon3, in this region. Presence of these modifications hinted an epigenetic regulation of Foxp3 involving the TSDR. In a last step, the transcriptional activity of TSDR was tested to delineate whether the TSDR serves as an alternative promoter or acts as a regulative element like an enhancer. Luciferase assays showed that TSDR is a regulative enhancer element, which loses transcriptional activity when methylated. Deletion mutants determined the most important fragment of the TSDR.

Schlagwörter: Transkriptionsfaktor Foxp3; regulatory T- cells ; TSDR = Treg specific demethylated region; epigenetic control

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Grundzüge des Immunsystems	1
1.2 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T- Lymphozyten – regulatorische T- Zellen (Tregs)	2
1.3 Regulation und Funktion des Transkriptionsfaktors Foxp3	4
1.4 Gen- Regulation und Chromatin- Struktur	8
1.4.1 DNS- Methylierung zur Inaktivierung genetischer Aktivität	8
1.4.2 Histon- Modifikation und Chromatin- Struktur	12
1.5 Erzeugung transgener Mäuse	14
1.5.1 Einfacher Genersatz in bakterielle, artifizielle Chromosomen (engl. Bacterial artificial chromosomes; BACs)	14
1.5.2 Weitere Rekombinationssysteme	15
1.6 Ziel der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Stammlösungen, Puffer und Medien	17
2.1.1 Allgemeine Lösungen	17
2.2 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur	18
2.2.1 Kultivierung von Bakterien	18
2.3 Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren	19
2.3.1 Präparation von DNS	19
2.3.2 Gelelektrophorese	20
2.3.3 Transfer von Nukleinsäuren	21
2.4 Lösungen und Medien für die Zellkultur	22
2.4.1 Kultivierung	22
2.5 Nukleinsäuren	24
2.5.1 Klonierungsvektoren	24
2.5.2 Rekombinante Plasmide	24
2.5.3 Bakterielle, artifizielle Chromosomen (engl. Bacterial artificial chromosomes; BAC)	25
2.5.4 Oligonukleotide	25
2.6 Größenstandard für Agarose- Gelelektrophorese	27

2.7	Bakterienstämme	27
2.8	Zelllinien	28
2.9	Antikörper und Fluorochrome	28
2.10	Reagenzien- Sätze (Kits)	29
2.11	Allgemeine Labormaterialien	30
2.12	Fertige Lösungen	30
2.13	Geräte	31
2.14	Versuchstiere	32
3	Methoden	33
3.1	DNS- Präparation	33
3.1.1	Analytische Plasmidisolierung aus Bakterien (Minipräparation)	33
3.1.2	Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien (Midipräparation)	33
3.1.3	Präparative, endotoxinfreie Plasmidisolierung aus Bakterien (Maxipräparation)	33
3.1.4	BAC- DNS- Isolierung	34
3.1.5	Isolierung genomischer DNS aus Kulturzellen	35
3.1.6	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	35
3.1.7	Natriumacetat- Fällung von DNS	35
3.1.8	RNS- Präparation	36
3.1.9	RNS- Isolierung	36
3.2	Polymerase- Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)	36
3.2.1	Ableiten von PCR- Primeren	37
3.3	Typischer PCR- Ansatz für die Taq- Polymerase	38
3.3.1	Typischer PCR- Ansatz für die Taq- Polymerase und Tgo- Polymerase	39
3.3.2	Typischer PCR- Ansatz für die Pwo- Polymerase	39
3.4	Herstellung von cDNS mit RNS- Matrize für die RTQ- PCR	40
3.5	RTQ- PCR (engl. real time quantitative PCR)	40
3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.6.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
3.6.2	Konzentrationsabschätzung durch Agarose- Gelelektrophorese	42
3.7	Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren	42
3.7.1	Native Agarose- Gelelektrophorese	42
3.8	Enzymatische Modifikation und <i>in vitro</i> - Rekombination von DNS	43

3.8.1	Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen	43
3.8.2	Glätten überhängender einzelsträngiger 5'- DNS- Enden	44
3.8.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	45
3.8.4	Ligation von DNS- Fragmenten	45
3.8.5	Klonierung von PCR- Fragmenten	46
3.8.6	Methylierung von DNS- Fragmenten	47
3.9	Transformation	47
3.9.1	Herstellung transformationskompetenter, einfrierbarer Bakterien	47
3.9.2	Durchführung der Transformation	48
3.9.3	Identifizierung rekombinanter Klone	48
3.10	Elektroporation von Bakterien zur homologen Rekombination	49
3.10.1	Vorbereitung der zu transfizierenden DNS	49
3.10.2	Methode des ET- Klonierens	49
3.11	Auftragsarbeiten	50
3.11.1	Sequenzierungen	50
3.11.2	Methylierungsanalyse	51
3.12	Transfer von Nukleinsäuren	51
3.12.1	Transfer von DNS (Southern- Blot)	51
3.13	Chemilumineszenter Nachweis von Nukleinsäuren und Hybridisierung mit einer markierten Sonde	52
3.13.1	Herstellung Biotin- markierter Sonden	53
3.13.2	Vorhybridisierung	53
3.13.3	Hybridisierung	53
3.13.4	Waschen	53
3.13.5	Chemilumineszente Detektion	54
3.14	Chromatin Immun- Präzipitations- Test (ChIP)	54
3.15	Methoden der Zellkultur von isolierten Mauszellen und Zelllinien der Maus	55
3.15.1	Auftauen von Zellen	55
3.15.2	Einfrieren von Zellen	55
3.15.3	Zellzahlbestimmung	56
3.15.4	Passagieren von adhärenenten Zellen	56
3.15.5	Ex vivo Isolierung von murinen Lymphozyten	56

3.15.6	Färbung von Zellen	57
3.15.7	Kulturbedingungen	57
3.16	Durchflusszytometrische Analyse	57
3.17	<i>In vitro</i> Proliferations- Test	58
3.18	Amaya Transfektionen	59
3.19	Adaptiver Transfer von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T- Zellen	59
3.20	Diphtheria Toxin Gabe zur Depletion von Tregs in den DEREK- Mäusen	60
3.21	Dualer Luciferase- Test	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Erzeugung einer transgenen Foxp3- Reportermaus	61
4.1.1	Strategie zur Erzeugung einer BAC- transgenen Maus mit einem Reporter im <i>foxp3</i> - Lokus	61
4.1.2	Klonierung des Zielgenvektors pBSK5`eYFPSVneo/kan3`	63
4.1.3	Analyse des Zielgenvektors	66
4.1.4	Herstellung und Analyse der transgenen Klone	67
4.1.5	Analyse der DEREK- Maus	73
4.2	Analyse von Foxp3 ⁺ T- Zellen	78
4.2.1	Stabilität von Foxp3 <i>in vivo</i>	78
4.2.2	Stabilität korreliert mit demethylierten CpGs in konservierter Region im Intron I	79
4.2.3	Foxp3- Expression korreliert mit suppressiver Kapazität	82
4.3	Analyse der Regulation des murinen <i>foxp3</i> - Lokus	84
4.3.1	Histon- Modifikationen korrelieren mit Foxp3- Expression	84
4.3.2	Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen in der TSDR	86
4.3.3	Analyse der transkriptionalen Aktivität der TSDR	88
5	Diskussion	98
5.1	Erzeugung einer Foxp3- transgenen Reportermaus	98
5.2	Analyse der DEREK- Maus – funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3	100
5.3	Expression und funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors Foxp3	102
5.4	Regulation der Transkription des Foxp3- Gens	103
5.4.1	Aufbau des <i>foxp3</i> - Lokus	103
5.4.2	Transkriptionale Aktivität der TSDR	105

5.4.3	Gen- Regulation und Chromatin- Struktur im <i>foxp3</i>- Lokus	106
5.5	Ausblick	107
6	Literaturverzeichnis	97
7	Anhang	112
7.1	Kommerzielle Sequenzierung (Agowa)	112
7.1.1	Sequenzierung des Zielgenvektors pBSK5`eYFPpA_{3'}	112
7.2	Methylierungsanalyse (Epiontis)	113
7.3	Vektorkarten verwendeter Klonierungsvektoren	115
7.4	Eidesstattliche Erklärung	120
7.5	Publikationsliste und Kongressteilnahme	121
7.5.1	Publikationsliste	121
7.5.2	Kongressteilnahme	121
7.6	Danksagung	122

Abkürzungsverzeichnis

- | | |
|-------------|--|
| • A | • Adenin |
| • Abb. | • Abbildung |
| • A. bidest | • zweifach destilliertes Wasser |
| • abs. | • absolut |
| • Ab | • Antikörper |
| • Ac | • Acetat |
| • Ag | • Antigen |
| • Amp | • Ampicillin(-Resistenzgen) |
| • APZ | • Antigen- präsentierende Zellen |
| • AS | • Aminosäure |
| • ATP | • Adenosintriphosphat |
| • bp/bps | • Basenpaare |
| • BrdU | • Bromodeoxyuridine |
| • BSA | • Rinderserum- Albumin |
| • bzw. | • beziehungsweise |
| • C | • Cytosin |
| • ca. | • circa |
| • cAMP | • zyklisches Adenosinmonophosphat |
| • Cam | • Chloramphenicol |
| • CFSE | • 5-Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester |
| • cm | • Zentimeter |
| • CTLA-4 | • Cytolytic T lymphocyte- associated antigen 4 |
| • Cy5 | • Indodicarbocyanin |
| • °C | • Grad Celsius |
| • Da | • Dalton |
| • dATP | • Desoxyadenosintriphosphat |
| • dCTP | • Desoxycytidintriphosphat |
| • deion. | • deionisiert |
| • DEPC | • Diethylpyrocarbonat |
| • dGTP | • Desoxyguanosintriphosphat |

• DMSO	• Dimethylsulfoxid
• DNS	• Desoxyribonukleinsäure
• dNTP	• 2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
• DRFZ	• Deutsches Rheumaforschungs- Zentrum
• DTH	• Delayed- type hypersensitivity
• DTT	• Dithiothreitol
• dTTP	• Desoxythymidintriphosphat
• <i>E. coli</i>	• <i>Escherichia coli</i>
• EDTA	• Ethylendiamintetraessigsäure
• engl.	• Englisch
• ES- Zellen	• embryonale Stammzellen
• <i>et al.</i>	• Et altera
• EtBr	• Ethidiumbromid
• EtOH	• Ethanol
• FACS	• Fluoreszenz- aktivierte Zellsortierung
• FCS	• fötales Kälberserum
• FITC	• Fluorescein- Isothiocyanat
• Foxp3	• Forkhead box protein 3
• FRT/ftt	• Flp recombination target
• FSC	• Vorwärts Scatter
• G	• Guanin
• g	• Gramm
• GFP	• Grün fluoreszierendes Protein
• h	• Stunde(n)
• HBS	• Hepes- Phosphat gepufferte Salze
• HR	• homologe Region
• Ig	• Immunoglobulin
• IL	• Interleukin
• Kan	• Kanamycin
• kb	• Kilobasenpaare (1000 bp)
• kDa	• Kilodalton (1000 Da)
• KR	• kodierende Region

• Ki	• Knock- In
• K- Mes	• 2N-morpholino- ethanesulfonische Säure
• KO	• Knock- Out
• konz.	• Konzentriert
• l	• Liter
• LB-Medium	• Luria- Bertani Medium
• LK	• Lymphknoten
• loxP	• locus of X- cross of P1
• Lsg.	• Lösung
• µg	• Mikrogramm
• µl	• Mikroliter
• M	• Molar
• mA	• Milliampere
• mAb	• Monoklonale Antikörper
• MACS	• Magnetische Zellsortierung
• MCS	• Vielfachklonierungsstelle
• mg	• Milligramm
• min	• Minute(n)
• ml	• Milliliter
• mLK	• Mesenteriale LN
• mM	• millimolar
• mRNS	• Boten (“messenger”)- RNS
• NaAc	• Natriumacetat
• NAD ⁺	• Nikotinamidadenindinukleotid
• neo/NEO	• Neomycin- Resistenzgen
• ng	• Nanogramm
• OD _x	• optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
• OVA	• Ovalbumin
• PBS	• Phosphat- gepufferte Salzlösung
• pBSK	• pBluescript II SK (2+)
• PCR	• Polymerase- Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
• PE	• Phycoerythrin

• PerCP	• Peridinin- Chlorophyll- Protein
• pH	• negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
• PI	• Propidium Iodid
• pLK	• Periphere LK
• Poly-A	• polyadenyliert
• poly(A)/pA	• Polyadenylierungssignal/Polyadenylierungsstelle
• PP	• Peyer's Patch
• RA	• Retinolsäure (engl. Retinoic acid)
• RNase	• Ribonuklease
• rRNS	• ribosomale RNS
• RNS	• Ribonukleinsäure
• RT	• Raumtemperatur / Reverse Transkription
• sec	• Sekunde
• SIP	• Shrimp Alkalische Phosphatase
• SSC	• Trinatriumcitrat
• SSC	• Seitwärts Scatter
• SV40	• Simian Virus 40
• T	• Thymin
• TAE	• Tris- Eisessig- EDTA Puffer
• TZR	• T Zell Rezeptor
• TE	• Tris- EDTA Puffer
• TFB	• Transformationspuffer
• tg	• Transgen
• TGF- β	• Transforming growth factor- β
• Treg	• Regulatorische T- Zellen
• Tris	• Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan
• u. a.	• unter anderem
• U	• Enzymeinheit (Unit)
• üN	• über Nacht
• UpM	• Umdrehungen pro Minute
• UTR	• untranslatierter Bereich
• UV	• ultraviolett

- | | |
|---------|-----------------------|
| • Vol. | • Volumen |
| • WT | • Wildtyp |
| • vgl. | • vergleiche |
| • v/v | • Volumen pro Volumen |
| • w/v | • Gewicht pro Volumen |
| • z. B. | • zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

Als wirksamen Schutzmechanismus vor Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen haben Vertebraten, insbesondere Säugetiere, das Immunsystem entwickelt. Das Immunsystem kann in eine angeborene und eine adaptive Immunität unterteilt werden. Die angeborene Immunität kann unspezifisch auf eindringende Pathogene reagieren und dient der frühen Abwehr. Diese Art der Immunität hat den Nachteil, dass es viele pathogene Keime nicht erkennt und kein immunologisches Gedächtnis entwickelt. Wesentlich spezifischer reagiert das System der adaptiven Immunität. Dieser hochentwickelte Teil des Immunsystems bildet das immunologische Gedächtnis aus und bietet dem Organismus dadurch einen Schutz vor Reinfektionen, welche durch das immunologische Gedächtnis schneller bekämpft werden können.

Die angeborene Immunität wird über Makrophagen, NK- Zellen und Granulozyten vermittelt. Sie entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Zellen. Ihre Hauptmechanismen sind Phagozytose von Pathogenen und Antigen- Präsentationen gegenüber den Zellen der adaptiven Immunität des Immunsystems.

Die Zellen der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten, es werden B- und T- Lymphozyten unterschieden. Durch die Aktivierung der adaptiven Immunität, durch Antigen- präsentierenden Zellen (APC), differenzieren die Lymphozyten in Effektorzellen. Ein Teil dieser differenzierenden Zellen werden keine Effektorzellen, sondern Gedächtniszellen („Memory“ Zellen), welchen bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen eine sehr viel schnellerer Immunantwort auslösen. B- Lymphozyten reifen im Knochenmark, und T- Lymphozyten im Thymus, welche durch eine zufällige Rekombination von Gensegmenten eine sehr hohe Diversität der leichten und schweren Ketten erhalten, den T- Zell- Rezeptor (TZR). T- Zellen erkennen und eliminieren infizierte Zellen, außerdem werden andere zelluläre Bestandteile, wie Makrophagen und B- Zellen durch T- Zellen in ihrer Funktion unterstützt. Die beschriebene Rekombination der Gensegmente führt nicht nur zu der hohen Diversität, sondern auch zu der Gefahr, dass Zellen Selbst- Antigene erkennen und gegen den Organismus vorgehen. Um dieser Gefahr der Selbsterkennung zu entgehen gibt es im Thymus eine negativ und positiv Selektion der T- Zellen. Dabei werden T- Zellen deren TZR eine zu starke Autoreaktivität zeigen an dieser Stelle eliminiert [2] ;[3] . Diesen Mechanismus der eine gewisse Unreaktivität hervorruft nennt man zentrale Toleranz. Einige autoreaktive T- Zellen entkommen aber im Thymus dem Mechanismus der zentralen Toleranz. Für diesen Fall gibt es in der Peripherie die periphere Toleranz. Dieser Mechanismus beruht auf Ignorance von Selbst- Antigenen, sowie klonale und anergische Eliminierung von autoreaktiven T- Zellen [4] ; [5] ; [6] . Weiterhin konnte festgestellt werden, dass an Orten von dominanter Toleranz bestimmte T- Zell Typen auftreten, welche die

Autoreaktivität aktiv unterdrücken (vgl. 1.2). Ein Fehler in dem Mechanismus der zentralen und peripheren Toleranz führt zu Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes Typ 1, Multipler Sklerose und rheumatischen Arthritis [7] .

1.2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T- Lymphozyten – regulatorische T- Zellen (Tregs)

In den frühen 70er Jahren wurden zum ersten Mal „suppressorische/regulatorische Zellen“ [8] ; [9] im Zusammenhang mit Toleranz erwähnt, belegt durch dominante Toleranz in thymektomierten Mäusen. Da aber keine eindeutigen Beweise, wie Marker und Art der Wirkungsweise gezeigt werden konnten, wurde dieser Zelltyp zu diesem Zeitpunkt sehr kontrovers diskutiert [10] . Erst durch die Beschreibung des Oberflächenmarkers CD25 durch Sakaguchi und Mitarbeiter im Jahre 1995 [11] rückte dieser Zelltyp wieder in den Fokus und wird seit dem als „regulatorische T- Zelle“ (Treg) beschrieben. In der Arbeit von Sakaguchi konnte gezeigt werden, dass 5-10% der CD4⁺ T- Zellen den Oberflächenmarker CD25 exprimieren. Diese CD4⁺CD25⁺ T- Zellen konnten, im Gegensatz zu CD4⁺CD25⁻ T- Zellen, Dosis- abhängig „graft- versus- Host“ Autoimmunerkrankungen verhindern. Im weiteren Verlauf der Forschung konnte T- Lymphozyten mit suppressorischen Eigenschaften eine entscheidende Funktion in verschiedenen Immunreaktionen zugeschrieben werden. Hierzu gehört vor allem die Vermittlung von Toleranz [12] ; [13] in der Autoimmunität [14] ; [15] ; [16] , wie z.B. in der Tumorentwicklung [17] ; [18] und in Entzündungsreaktionen [19] ; [20] ; [21] ; [22] . Neben dem Marker CD25 wurden noch weitere Moleküle beschrieben welche auf der Oberfläche von Tregs exprimiert werden. Hierzu gehören Faktoren, wie CTLA-4 (engl. Cytolytic T lymphocyte- associated antigen 4) [23] und GITR (engl. Glucocorticoid- induced TNF receptor) [24] . Diese Moleküle werden allerdings nicht nur auf Tregs exprimiert, sondern im Verlaufe der Aktivierung von T- Zellen, auf diesen Zellen ebenfalls exprimiert. Dieser Umstand führt dazu, dass man mit dieser Oberflächenmarker nicht zwischen Tregs und aktivierten Zellen unterscheiden kann. Dieser Umstand führt dazu, dass nach weiteren Marker für Tregs geforscht wurde. In diesem Zusammenhang konnten die Oberflächenmoleküle CD103 [25] , Neuropilin-1 [26] und GPR 83 (engl. G- protein coupled receptor 83) [27] als potentielle Kandidaten aufgezeigt werden.

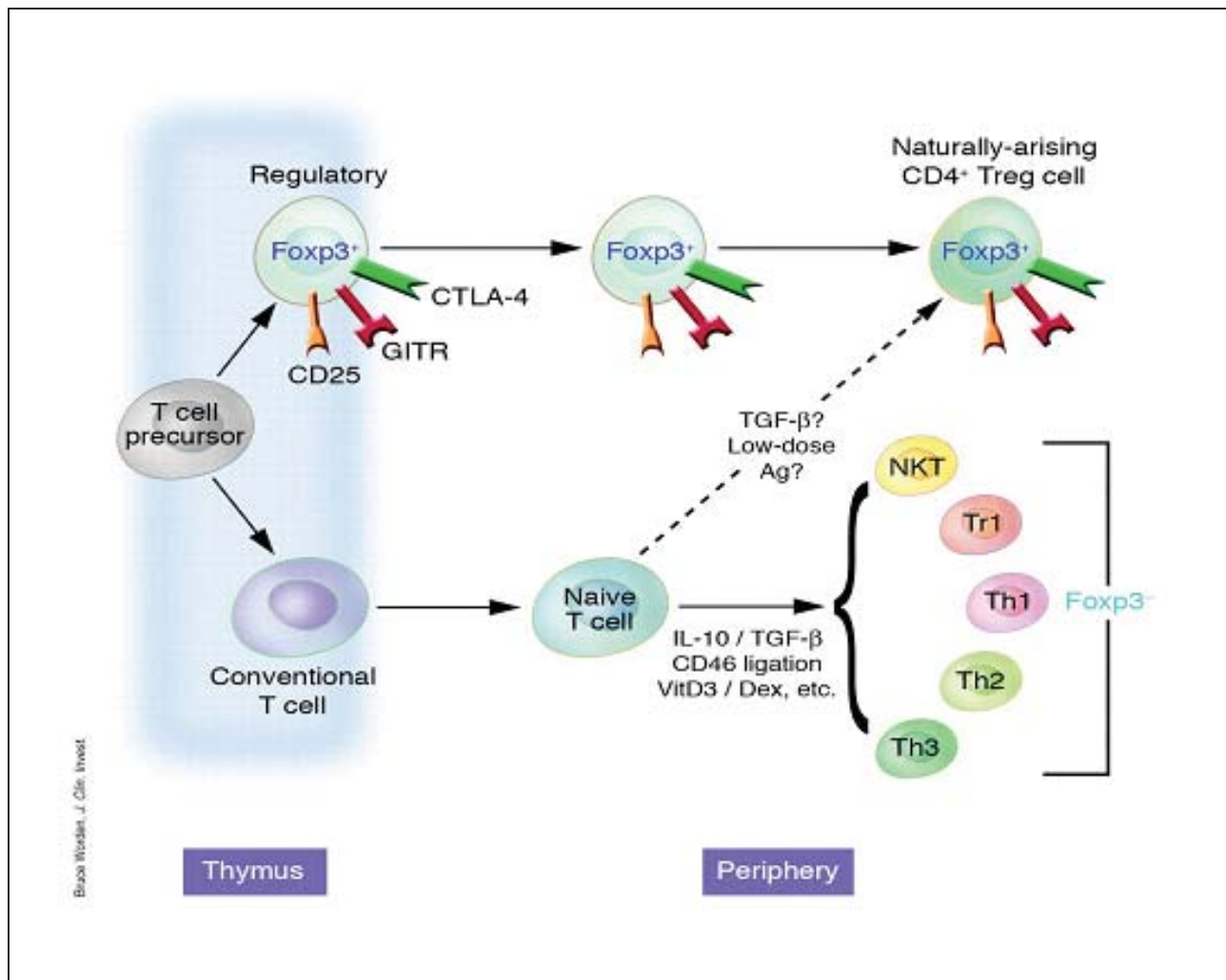


Abbildung 1: Übersicht zur Entstehung von $CD25^+ CD4^+$ T- Zellen in Thymus und Peripherie

Regulatorische $CD4^+$ T- Zellen können im Thymus und der Peripherie entstehen. Die genauen Bedingungen der Entwicklung und das Zusammenspiel der einzelnen entstandenen T- Zellen sind noch nicht weiter beschrieben worden. Thymus generierte Tregs, auch bekannt als natürliche Tregs oder $CD4^+CD25^+$ Tregs entstehen im Thymus. Durch eine Kombination aus TZR Stimulus und kostimulatorischen Signalen. In der Peripherie entstandene Tregs, z.B. Tr1- oder Th3- Zellen, werden durch eine Vielzahl von Bedingungen erzeugt. $CD4^+Foxp3^-$ T- Zellen können *in vitro* durch die Gabe von TGF- β in $Foxp3^+$ Tregs konvertiert werden. Abbildung aus Fehervari *et al.* 2005 [28] .

Der bedeutendste Faktor zur Diskriminierung von Tregs wurde im Jahre 2001 charakterisiert, dabei handelt es sich um den Transkriptionsfaktor Foxp3 (engl. Forkhead- box- factor P3). Foxp3 ist zuerst in der „scurfy“ Maus [29] ; [30] ; [31] beschrieben worden. Diese Maus trägt eine deletierende Mutation im Gen für Foxp3, was zur Folge hat, dass kein vollständiges Foxp3 Protein translatiert wird. Auf Grund dieser Mutation werden in der Maus zahlreiche Autoimmunerkrankungen ausgebildet. Der Phänotyp der „scurfy“- Maus kann durch die Überexpression von Foxp3 oder den adaptiven Transfer von $CD4^+CD25^+$ T- Zellen gerettet werden [32] ; [23] . Diese Experimente zeigten, dass es sich bei

den Transkriptionsfaktor Foxp3 um den „Mastertranskriptionsfaktor“ für Tregs handelt. Weiterhin wurde gezeigt, dass T- Zellen, welche durch ein Knock- In von dem Reporter gen eGFP bzw. eYFP kein Foxp3 exprimieren können, sogenannte „wannabe- Tregs“, eine normale T- Zellreifung im Thymus durchlaufen, aber auf Grund fehlender Foxp3- Expression keine suppressorischen Eigenschaften zeigen [33] ; [34] . Im humanen System ist die Autoimmunerkrankung IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X- linked), die ebenfalls auf Mutationen im Foxp3- Gen zurückzuführen ist, beschrieben [35] . IPEX- Patienten zeigen die gleichen Autoimmunerkrankungen, wie die „scurfy“- Maus. Die phänotypische Analyse und funktionelle Studie von Foxp3⁺ T-Zellen gestaltet sich allerdings sehr schwierig, da Foxp3 als Transkriptionsfaktor im Kern lokalisiert ist und nur durch interzelluläre Färbungen nachgewiesen werden kann. Durch die Entwicklung von Reportermäusen [36] ; [37] ; [38] ; (140); (32); (60) sind auch diese Studien möglich.

Wie in Abbildung 1-1 dargestellt können Tregs im Thymus und in der Peripherie entstehen. Die CD4⁺CD25⁺ Tregs, welche im Thymus entstehen, werden als natürlichen Tregs bezeichnet. Analysen zeigen, dass Tregs während der positiv und negativ Selektion entstehen. Es handelt sich dabei um T- Zellen, welche eine gewisse Autoreaktivität besitzen, aber der Eliminierung entkommen [39] ; [40] . In der Peripherie entstehen die sogenannten induzierten Tregs, welche durch die Anwesenheit von TGF- β und/oder Antigen induziert werden [41] ; [42] ; [43] , (66). Eine charakteristische Eigenschaft von Tregs ist die oben erwähnte Unterdrückung der Aktivität von Effektor- T- Zellen zur Vermittlung von Toleranz. Tregs supprimieren in vitro die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ T- Zellen. Diese Suppression erfolgt Zell- Zell- Kontakt abhängig und benötigt die Zugabe von exogenen IL-2 [44] . CD4⁺CD25⁺ Tregs können, obwohl sie ihre suppressorische Aktivität nur durch antigen- spezifisch oder CD3- vermittelte Aktivierung erlangen, antigen- unspezifisch die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen unterdrücken [45] ; [46] .

Neben den CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T- Zellen wurden noch weitere Zelltypen mit regulatorischem Potential beschrieben. Dazu gehören die TGF- β produzierenden Th3- Zellen [47] , die IL-10 sekretierenden Tr1 Zellen [48] sowie CD8⁺ T- Zellen [49] . Diese Zellarten werden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

1.3 Regulation und Funktion des Transkriptionsfaktors Foxp3

1.3.1 Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3

Die Regulation des Transkriptionsfaktors Foxp3 ist für die Funktion von Tregs von entscheidender Bedeutung. Wie schon am Ende des Abschnittes 1.2 beschrieben, entwickeln sich T- Zellen im

Thymus bis zu einem gewissen Punkt in die Richtung möglicher Tregs, fehlt allerdings in der weiteren Differenzierung der Transkriptionsfaktor Foxp3 entstehen keine Tregs [33] ; [34] .

Ein wesentlicher Bestandteil der Regulation der Foxp3- Expression ist das T- Zell Rezeptor- Signal (kurz TZR- Signal). Durch die Stimulation des TZR wird die Signalkaskade über die bekannten beteiligten Faktoren, wie die Kinasen Lck oder MAPKs oder den Faktor Ras aktiviert [50] . Im Zusammenhang mit der Aktivierung der Foxp3- Expression sind vor allem die Faktoren Phospholipase C- γ [51] und der Linker für Aktivierung von T- Zellen (LAT) [51] , welche wichtige Bestandteile des TZR- Signalweges sind, beschrieben worden. Am Ende der resultierenden Signalkaskade ist die genaue Aktivierung der Expression von Foxp3- Gens noch nicht beschrieben worden. Im humanen Lokus konnte von Mantel *et al* [52] der „core“- Promoter identifiziert worden. In diesem Bereich wurden auch Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NFAT und Ap-1 aufgezeigt. Die Bindung der beiden Faktoren an den Promoter ist für die Expression des humanen Foxp3- Gens [52] von entscheidender Bedeutung. Im murinen System konnte diese Aussage bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gezeigt werden. Hier scheint die Bindung von NFAT an den Foxp3 Lokus eher keine Rolle zu spielen. Der Doppel Knock- Out von NFATc2/c3 zeigte keinen Einfluss auf die murine Foxp3- Expression [53] . Kostimulatorische Signale spielen bei der Expression von Foxp3 eine entscheidende Rolle wie der TZR- Stimulus. Sie unterstützen das TZR- Signal noch in seiner Aktivierung der Transkription von Foxp3. Hierbei sind die Rezeptoren und Liganden CD28, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), „programmed cell death 1“ Rezeptor (PD-1) und CD152 (CTLA-4) von bedeutender Rolle. CD80 und CD86 sind die Liganden für CTLA-4 und CD28 und ihr Zusammenspiel führt zur Induktion der Foxp3- Expression in der Peripherie und dem Thymus [54] ; [55] . PD-1 wurde ebenfalls auf CD4⁺CD25⁺ Tregs gefunden [56] und scheint für die Expression von Foxp3 in der Peripherie wichtig zu sein und wirkt auch im Zusammenhang mit Estrogen. Estrogen kann PD-1 -abhängig und -unabhängig die Foxp3- Expression regulieren [57] . Auch bei den Signalwegen der kostimulatorischen Moleküle ist der Faktor, der direkt an den Foxp3- Gen- Lokus bindet, ähnlich zu dem TZR- Signal, noch nicht näher beschrieben worden.

Als die beiden wichtigsten Faktoren für die Foxp3- Expression wurden in vielen Arbeiten IL-2 und TGF- β postuliert. Für IL-2 ist vor allem im humanen System beschrieben worden, die Foxp3- Expression über den STAT- abhängigen Signaltransduktionsweg zu induzieren [58] . Genauer gesagt induziert die Bindung des IL-2 an den IL-2- Rezeptor die Bindung von STAT3 und STAT5 im Bereich des ersten Introns des humanen *foxp3*- Lokus. Im murinen System ist die Rolle von IL-2 für die Induktion der Foxp3- Expression umstritten. Es werden indirekte und direkte, sowie IL-2 abhängige und unabhängige Systeme vorgestellt [59] ; [60] ; [61] ; [62] . Burchill *et al.* [63] beschrieb für das murine System einen ähnlicher Mechanismus, wie für das humane System beschrieben worden ist (38). In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass der IL-2 Rezeptor β STAT5 vermittelt, die Foxp3- Expression induziert. An diesen Rezeptor kann neben IL-2 auch IL-15 binden. IL-15 kann in den IL-2^{-/-} Tieren die die IL-2 Defizienz kompensieren. Durch diesen Umstand kann der Eindruck entstehen, dass die Induktion der Expression IL-2 abhängig und unabhängig ist (43).

Vor allem bei der Induktion von Foxp3 *in vitro* spielt TGF- β eine entscheidende Rolle. Neben unseren eigenen Arbeiten [1] konnten mehrere Arbeitsgruppen die Rolle von TGF- β bei der Induktion der Foxp3- Expression zeigen [64] ; [65] ; [66] ; [67] ; [68] . TGF- β induziert die Phosphorylierung der SMAD- Faktoren, welche dann an den Lokus des murinen Foxp3 binden können [69] ; [70] ; [71] . In der Arbeit von Tone *et al.* [71] konnte gezeigt werden, dass TGF- β im Zusammenspiel mit dem TZR-Signal einen Enhancer im ersten Intron des murinen *foxp3*- Lokus aktiviert, welche die Expression des Foxp3- Gen induziert. Weiterhin wurde beschrieben, dass durch TGF- β induzierte Foxp3- Proteine die Expression von SMAD7 unterdrücken [28] und somit den Einfluss von TGF- β verstärkt wird (positiver autoregulatorischer Loop). Retinolsäure („Retonic Acid“; RA) kann die Induktion von Foxp3 in Tregs verstärken ([72] ; [73] ; [74] ; [75] . Gandhi *et al.* [76] konnten zeigen, dass unreife dendritische Zellen TGF- β und LAP (latency- associated peptide) auf ihrer Oberfläche exprimieren, was dazu führt, dass die Proliferation von Th1- Zellen inhibiert wird und Tregs induziert werden. Weiterhin konnte in Kang *et al.* [77] eine Verbindung von RA vermittelter Foxp3- Induktion im Zusammenhang mit Histon- Acetylierung im „core“- Promoter des *foxp3*- Lokus aufgezeigt werden. Dieser Umstand zeigt eine Beteiligung von Histon- Modifikationen an der Expression von Foxp3, welches im Zuge dieser Arbeit weiter analysiert wird.

Weiteren Einfluss auf die Foxp3- Expression haben Toll- like Rezeptoren (TLR), vermittelt vor allem über das Adaptermolekül MyD88 [78] ; [79] und IFN- γ [80] . Den TLR- Liganden wird auch eine Bedeutung in der Regulation der Foxp3- Expression zu geschrieben [81] . Ebenfalls für die Induktion von Foxp3, allerdings nur in Hemagglutinin- spezifischen Tregs, wird STAT 6 eine wichtige Rolle zu geschrieben [82] . Die antigen- spezifischen Tregs entstehen nur durch die simultane Stimulation über den TZR und den IL-4- Rezeptor und die daraus resultierende STAT6 Aktivierung. IL-6 ist bis zum jetzigen Zeitpunkt, als einer der wenigen Faktoren bekannt, der die Foxp3- Expression unterdrücken kann. Gezeigt wurde dieses an Hand der simultanen Stimulation von naiven Zellen mit TGF- β und IL-6, welches nicht in Induktion von Tregs resultierte, sondern die Differenzierung zu IL-17 produzierenden Th17- Zellen bewirkte [83] .

Auf posttranskriptioneller Ebene gibt es höchstwahrscheinlich weitere Regulationsmechanismen der Expression des Foxp3- Proteins. Fontenot *et al.* [32] beschreiben eine unterschiedliche Expression von Foxp3 mRNA und Foxp3- Protein. Vor Stimulation liegen große Menge der Foxp3 mRNA und wenig Protein vor, nach Stimulation hatte sich das Bild umgedreht. In der Arbeit von Cobb *et al.* [84] wird deutlich, dass microRNAs eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation des Foxp3- Proteins spielen, welche die Translation steuern können.

1.3.2 Funktion des Transkriptionsfaktors Foxp3

In Arbeiten von Marsonet *et al.* [85] und Zheng *et al.* [86] werden Zielgene des Foxp3- Proteins beschrieben, welche durch den Vergleich von Foxp3⁺ und Foxp3⁻ T- Zellen identifiziert werden konnten. In diesen Arbeiten wurde ebenfalls die Foxp3- Bindung an die Zielgene analysiert, welche entweder hoch oder runter regulierte wurden. Die meisten, der analysierten Gene werden durch Foxp3 herunter reguliert, somit wirkt Foxp3 als Repressor. Es gibt aber auch einige Gene, welche durch die Anwesenheit von Foxp3 aktiviert werden, hier wirkt Foxp3 als Aktivator. Am besten beschrieben ist die Wirkung von Foxp3 auf die Expression von IL-2 und IFN γ in Tregs. In den Jahren 2001 und 2005 wurden erste Hinweise dafür gefunden, dass Foxp3 mit den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NFAT interagieren kann und dadurch die Expression von IFN- γ und IL-2 unterdrückt wird [87] ; [88] . Im Vergleich hierzu wurden auch Foxp1 und Foxp2, zwei weitere Mitglieder der „forkhead box“ Transkriptionsfaktor- Familie untersucht und es zeigte sich, dass nur Foxp3 diese Interaktionen eingehen kann und die daraus resultierende Abschaltung der Zytokinexpression allein auf Foxp3 zurückzuführen ist. In einer späteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Foxp3 mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 um die Interaktion mit NFAT konkurriert. Bilden NFAT und AP-1 einen Komplex, wird das IL-2 Gen abgelesen. Bindet im Gegensatz dazu Foxp3 an NFAT, wird die Expression von IL-2 unterdrückt [89] . Weitere Arbeiten zeigten, dass noch zusätzliche Faktoren im Zusammenspiel mit Foxp3 an der Regulation der Expression von IL-2 und IFN- γ beteiligt sind, wie z.B. die Bindung des AML1/Runx1 Komplexes an NFAT, wodurch eine reduzierte Promoteraktivität im IL-2- und IFN- γ - Lokus induziert wird. In Tregs bindet Foxp3 mit AML-1/Runx1 zusammen an NFAT und übt somit seine Suppressor- Funktion aus [90] . Es gibt die Annahme, dass die Bindungskapazität von Foxp3 an NFAT und der dadurch resultierenden Verdrängung von AP-1 an NFAT, durch TGF- β , den TZR- Stimulus und RA beeinflusst werden kann (mündliche Mitteilung V. Heissmeyer, München). Am IFN- γ - und IL-2- Lokus konnte nicht nur die Interaktion von NFAT und AML-1/Runx1 mit Foxp3, sondern auch eine Interaktion von Foxp3 mit Histon Deacetylasen (HDAC7 und HDAC9) gezeigt werden[91] ; [92] . Am CD25-, CTLA-4- und GITR- Lokus konnte ein Zusammenspiel von Foxp3 mit Acetylasen (z.B. TIP60) nachgewiesen werden [91] ; [92] . Foxp3 ist somit aktiv an der Remodelierung von Chromatin für die Stilllegung (Histon- Deacetylierung) bzw. Aktivierung (Histon- Acetylierung) der Expression von Genen beteiligt. Auf den Prozess der Chromatin- Modifikationen für die aktive Transkription von Genen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.4 Gen- Regulation und Chromatin- Struktur

An der Regulation genetischer Aktivität ist das Chromatin beteiligt. Genaktivität findet man im locker gepackten Euchromatin. Im Bereich des dicht gepackten Heterochromatins ist keine genetische Aktivität messbar. Eines der meist untersuchten Beispiele für diesen Zusammenhang ist das weibliche X- Chromosom. Das heterochromatische X- Chromosom ist weitgehend inaktiv, während auf dem euchromatischen X- Chromosom die Gene aktiv sind [93] . Die De- bzw. Methylierung von DNS ist ein weiterer Regulationsmechanismus, um die Aktivität von Genen zu steigern oder zu inhibieren.

1.4.1 DNS- Methylierung zur Inaktivierung genetischer Aktivität

Das Methylierungsmuster von Genen ist für die Gen- Expression vor allem im Rahmen der Epigenetik von entscheidender Bedeutung. Viele Erbkrankheiten, wie z.B. das Prader- Willi- Syndrom, das Angelman- Syndrom oder das Beckwith- Wiedemann- Syndrom sind durch ein fehlerhaftes „Imprinting“, d.h. eine fehlerhafte Methylierung bzw. Demethylierung der DNS gekennzeichnet [93] . Die Methylierung erfolgt, wie in Abbildung 1-2 dargestellt, am Cytosin- Baustein durch Anhängen einer Methylgruppe. Die Methylierung von Cytosin im Zusammenhang mit dem Motiv CpG findet man im Genom von fast allen höheren Lebewesen.

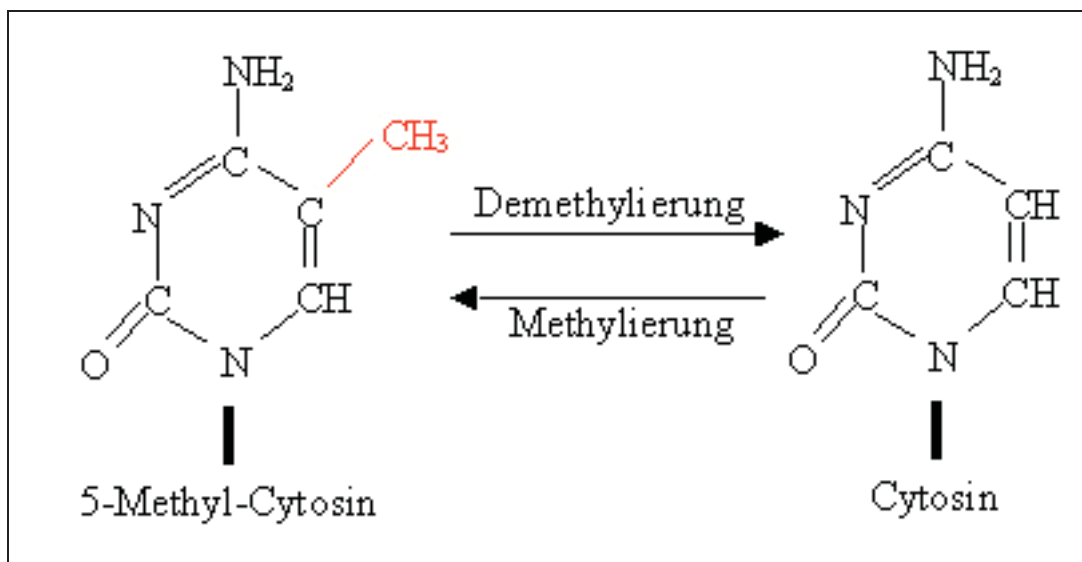


Abbildung 2: **Darstellung der Methylierung des Cytosins**

Molekülstruktur des 5-Methyl-Cytosins und des Cytosins.

Durch Deaminierung wird 5-Methyl-Cytosin, welches immer in der Basenabfolge CpG zu finden ist, zu Thymin umgewandelt. Auf Grund dieser Umwandlung spricht man deswegen bei den CpG- Inseln, d.h. bei DNS- Bereichen mit einem statistisch erhöhten Anteil an CpG- Motiven, auch von „Hot Spots“ für Mutationen. Da der Einbau von Thymin in Cytosin nicht revertierbar ist, kommt es im weiteren Verlauf der Replikation somit zum Einbau eines Adenins anstatt eines Guanins. Wegen dieser Mutation treten CpG- Abfolgen seltener auf, als man es erwarten würde. Auffällig an den CpG- Inseln ist eine weitere strukturelle Besonderheit im Genom von Säugetieren. Sie treten meistens im Bereich von Promotoren vor Genen auf. Bei aktiven Genen sind die CpG- Inseln demethyliert, während sie bei inaktiven Genen methyliert vorliegen. Die DNS- Methylierung scheint mit der Inaktivierung von Genen zu korrelieren. Die Inaktivierung der Genexpression wird durch das Enzym, Methyl- CpG- Bindeprotein 2 (MeCP2) vermittelt. MeCP2 bindet an die Methylgruppe von 5-Methyl- Cytosin. Dieses Bindeprotein gehört zu einem Proteinkomplex, zu dem auch Histon- Deacetylasen gehören, welche an der Umwandlung der Chromatinstruktur von einer offenen Struktur (Heterochromatin) zu dem dicht gepackten Euchromatin beteiligt sind [93] .

Das Methylierungsmuster, welches jedes Säugetier trägt, entsteht in seiner embryonalen Entwicklung. Nach der Befruchtung liegen alle CpG- Folgen in einem demethylierten Zustand vor. Mit der Implantation des Embryos im Uterus erfolgt eine unspezifische Methylierung aller CpG- Inseln. Die „Feinregulierung“ des Methylierungsmuster erfolgt in der weiteren embryonalen Entwicklung. In einem ersten Schritt werden zuerst die CpG- Inseln von sogenannten Haushaltsgenen demethyliert, danach die jeweils Zelltyp- und entwicklungsspezifischen Gene, die von den Zellen gebraucht werden. Für die Erhaltung des Methylierungsmusters sind, die sogenannten DNS- Methyltransferasen (Dnmt) verantwortlich. Es sind bis jetzt drei Dnmt bekannt, Dnmt-1, Dnmt-3a und Dnmt-3b. Dnmt-1 überträgt bei der Replikation der DNS das Methylierungsmuster des alten DNS- Stranges auf den neu replizierten DNS- Strang (Abbildung 1-3). Für diese Aufgabe folgt die Methyltransferase Dnmt-1 dem Replikationskomplex, wobei sie auf dem parentalen Strang eine schon vorhandene Methylierung der Cytosine als Matrize benötigt [93] . Bei diesem Ablauf kann es zu einer passiven Demethylierung der DNS kommen, da z.B. Enzyme an 5-Methyl-Cytosine im parentalen Strang gebunden sein können und somit die Dnmt-1 das Methylierungsmuster nicht erkennen kann [94] .

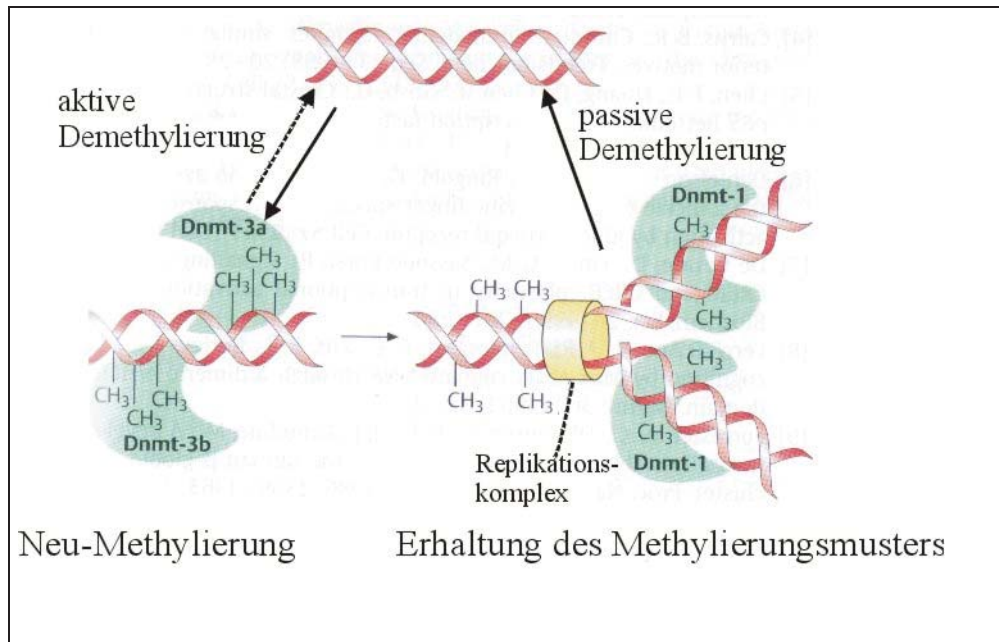


Abbildung 3: **Methylierung und Demethylierung von DNS**

Links: Die Dnmt-3a und 3b übertragen Methyl- Gruppen auf Cytosine in CpG- Inseln.

Rechts: Das Enzym Dnmt-1 folgt dem Replikationskomplex und überträgt das Methylierungsmuster des parental Stranges auf den neu- synthetisierten Strang. Molekulare Genetik, Knippers, 8. Auflage

Während Dnmt-1 für die Erhaltung des Methylierungsmusters verantwortlich ist, sind Dnmt-3a und Dnmt-3b für die Neu- Methylierung der DNS zuständig. Sie können an demethylierten CpG- Inseln vor aktiven Genen die CpG- Folge wieder methylieren und somit eine Reduktion der Genaktivität verursachen. Auf diesem Weg werden nicht mehr benötigte Gene wieder abgeschaltet.

Die in der frühen embryonalen Entwicklung komplette Demethylierung wird durch DNS- Demethylasen vermittelt. Diese sind allerdings in der späteren Entwicklung, wenn bestimmte Gene eingeschaltet werden, nicht aktiv. Hierfür muss es andere DNS- Methylasen geben. Die aktive Demethylierung wurde bis vor kurzer Zeit nur theoretisch vermutet, da es bis zu diesem Zeitpunkt niemandem gelungen war, eine aktive Demethylierung durch eine DNS- Methylase nachzuweisen. Auf Grund dieser Tatsache spricht man korrekt von einer nicht erfolgten „de novo Methylierung“ und nicht Demethylierung, da diese experimentell noch nicht nachgewiesen werden konnte. Für ein besseres Verständnis wurde in dieser Arbeit immer von Demethylierung und nicht von der Inhibition der „de novo Methylierung“ gesprochen.

In Pflanzen wurde zum ersten Mal eine DNS- Demethylase „Demeter“ beschrieben, welche eine aktive Demethylierung der DNS durchführt [95] . Weiterhin konnte von Barreto *et al.* [96] zum ersten Mal auch eine aktive Demethylierung durch das Enzym mit dem Namen *Gadd45a* in *Xenopus laevis* Oozyten postuliert werden. Damit scheint der Beweis für die schon lange bestehende Vermutung der Existenz von Demethylasen in Zellen nach der frühen embryonalen Entwicklung erbracht zu sein.

In T- Zellen ist vor allem für Zytokin- Gene ein Zusammenhang zwischen genetischer Aktivität und der Demethylierung des Promoters beschrieben worden [97] ; [98] . In der Arbeit von Tykocinski *et al.* [99] konnte gezeigt werden, dass die Transkription des IL-4 Gens nur erfolgt, wenn die CpG- Insel des IL-4 Promoters demethyliert und die Histone acetyliert vorliegen. Auch für die Expression von STAT4 in humanen T- Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Demethylierung der im STAT4- Locus befindlichen CpG- Insel für eine erfolgreiche Transkription des STAT4 Gens notwendig ist [100] . Für den Locus des IL-2 Zytokins konnte neben einer Demethylierung einer Enhancer- Region gezeigt werden, dass nach der Demethylierung das Protein Oct-1 an diese Region bindet und es zu einer Chromatinveränderung kommt. Die Bindung von Oct-1 an diesen Enhancer hat außerdem die Folge, dass die IL-2 Expression stabilisiert wird und somit eine Art des IL-2 Gedächtnisses in der T- Zelle festlegt [101] . In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch im Foxp3- Genlocus eine Region existiert, die differentiell methyliert vorliegt (74). Die Arbeit zeigt, dass die als TSDR (Treg specific demethylated region) benannte Region in natürlichen Tregs demethyliert vorliegt (vgl. auch Abbildung 1-4). Diese Region liegt im ersten Intron des *foxp3*- Locus (vgl. Abb. 1-4 Amp. 1+2), eine weitere analysierte CpG- Motiv reiche Region im Intron sieben (vgl. Abb. 1-4 Amp. 3+4) zeigte diese differentielle Demethylierung nicht. In T- Zellen, in denen keine Foxp3- Expression nachweisbar ist, ist die TSDR dagegen vollständig methyliert.

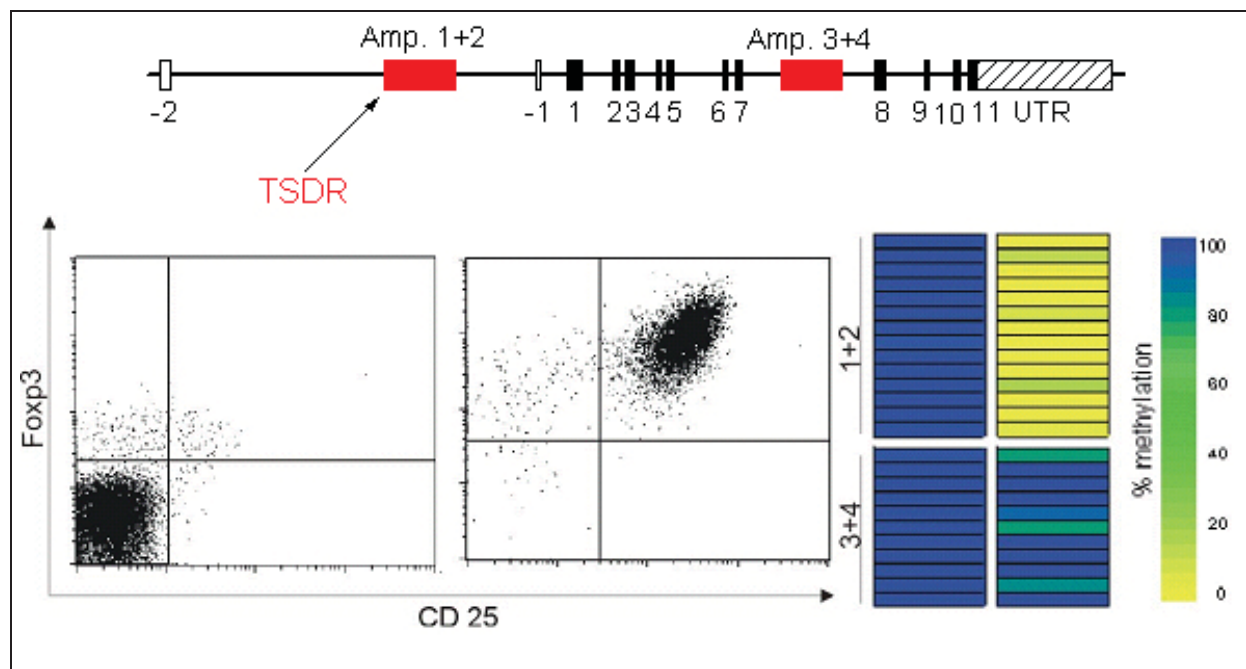


Abbildung 4: **Methylierungsstatus von ex vivo isolierten CD25⁺ T- Zellen**

Dargestellt ist der murine *foxp3*- Locus mit den vier analysierten Amplikons (Amp.). Die auf CD25⁺ und CD25⁻ sortierten T- Zellen zeigten, dass die CD25 mit Foxp3 korreliert. In der Methylierungsanalyse sind die Amplikons eins und zwei, sowie drei und vier dargestellt; links die der CD25⁻ und rechts die der CD25⁺ T- Zellen; ein Kästchen entspricht einem analysiertem CpG; der Index für den Methylierungsstatus ist als Farbskala dargestellt (gelb = vollständig demethyliert, blau = vollständig methyliert).

TSDR = Treg specific demethylated region. Abbildung nach Floess*, Freyer* *et al.* 2007 [102] .

Ähnlich dem IL-4 Gen scheint auch bei Foxp3 die Expression vom Methylierungsstatus der im Genlokus liegenden CpG- Abfolge abhängig zu sein.

1.4.2 Histon- Modifikation und Chromatin- Struktur

Die Umwandlung der Chromatinstruktur, dass sogenannte „Remodeling“ wird durch Histon-Modifikationen eingeleitet bzw. begünstigt [93] . Die bekannteste Histon Modifikation ist die Acetylierung der Histone. Eine Acetylierung führt zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur und ermöglicht weiteren Enzymen den Zugang zur DNS (vgl. Abbildung 1-5). Die Acetylierung der Histone wird durch die sogenannten Histon- Acetyl- Transferasen (HAT) und Histon- Deacetylasen vermittelt. Die HATs acetylieren die Histone und die HADCs Deacetylierung die Histone und ermöglichen die Öffnung der Chromatinstruktur (93).

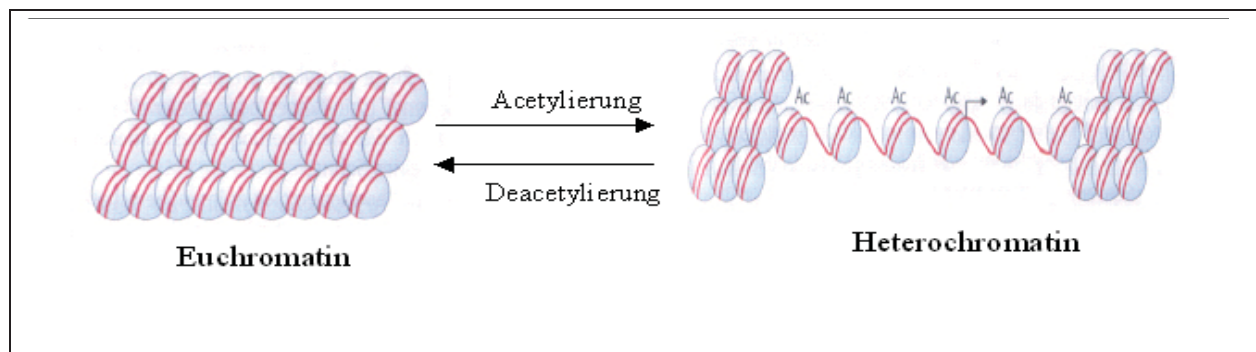


Abbildung 5: **Histon- Acetylierung führt zu offenen Chromatin- Strukturen**

Die Acetylierung führt zur offenen Heterochromatin- Struktur, Deacetylierung der Histone führt zu dichtgepacktem Euchromatin; Ac=Acetyl-Gruppe.

Weiterhin können die Histone neben der Acetylierung auch methyliert werden. Im Gegensatz zur Methylierung der DNS ist die Wirkung der Methylierung der Histone in den meisten Fällen genau gegensätzlich. Bei der Methylierung von Histonen wird die Chromatinstruktur gelockert und es kommt zur genetischen Aktivität, nicht zur Inaktivierung der Genexpression wie bei der Methylierung der DNS. Es gibt auch einige wenigen Histon- Modifikation, die zur Bildung von Euchromatin führen, bei denen die Histone demethyliert werden [103] ; [104] . Im Falle dieser Arbeit wurden aber nur methylierte Histon- Modifikationen analysiert.

In T- Zellen wurden schon im Zusammenhang mit der Expression von einigen Genen Histon-Modifikationen beschrieben. Beispiele hierfür sind die Genregion des Gens für das Zytokin IFN- γ in natürlichen Killerzellen [105] oder des IL-10- Locus in Makrophagen [106] . In Tregs konnte gezeigt werden, dass am IL-2 Locus nicht nur Foxp3 mit AP-1 um die Bindung von NFAT konkurrieren (vgl. Abschnitt 1.3.2), sondern auch im Gegensatz zu naiven T- Zellen keine Histon- Modifikationen stattfinden [107] . Im IL-4- Locus wurde neben den in Abschnitt 1.4.1 beschriebenen Methylierungsmustern auch für die Expression notwendige Histon- Modifikationen aufgezeigt [99] . Dieses weist darauf hin, dass Histon Modifikationen und DNS- Methylierung in einer engen Kooperation die genetische Aktivität regulieren können.

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht geklärt in welcher Reihenfolge die Histon- Modifikationen und DNS- Methylierung stattfinden, d.h. welcher Mechanismus zuerst greift. Es ist dennoch klar, dass beide Modifikationen zusammen die Genexpression regulieren [108] . Ein interessanter Aspekt ist somit, das Zusammenspiel dieser beiden Regulationsmechanismen auch am *foxp3*- Locus im Bereich der TSDR zu überprüfen.

1.5 Erzeugung transgener Mäuse

Im Verlauf dieser Arbeit sollte für die bessere Analyse der Funktion und Regulation des Transkriptionsfaktors Foxp3 eine bakterielle, artifizielle Chromosomen (engl. Bacterial Artificial Chromosome; BAC) transgene Maus erzeugt werden. Diese BAC- transgene Maus exprimiert unter der Kontrolle des Foxp3- Promoters das Reporterprotein verstärktes Gelb- fluoreszierendes Protein (engl. enhanced yellow fluorescenc protein; eYFP).

1.5.1 Einfacher Genersatz in bakterielle, artifizielle Chromosomen (engl. Bacterial artificial chromosomes; BACs)

BACs entstanden in großer Anzahl bei den Sequenzierungsanalysen diverser Genome [109] ; [110] ; [111] . Die BACs enthalten große Fragmente der Genome und können für die schnelle Erzeugung transgener Mäuse genutzt werden [112] . Der einfache Genersatz, welcher normalerweise in den embryonalen Stammzellen (ES- Zellen) der Maus stattfindet, kann nun in den leichter zu handhabenden Bakterien erfolgen. Über die Methode des ET- Klonierens (vgl. 3.10.2) [113] erfolgt der Austausch einer Gensequenz mittels homologer Rekombination mit einem Zielgenvektor, welcher die Sequenz der erwünschten einzubringenden Region und homologe Bereiche für die zielgerichtete Rekombination enthält. Die homologe Rekombination wird in den Bakterien durch die Rekombinasen E und T vermittelt [113] ; [114] . Man kann mit einem Ersetzungs- oder Insertionsvektor als Zielgenvektor arbeiten. Ein Ersetzungsvektor mit zwei kleinen homologen Bereichen und dem Selektionsgen, rekombiniert dabei mit der Zielsequenz über ein „Crossing Over“ und ersetzt das endogene Fragment mit dem des Selektionsgens. Bei diesem werden keine speziellen Rekombinasen benötigt, sondern es wird der Ablauf des „Crossing Overs“ von homologen DNS- Sequenzen, welcher auch in der Meiose auftritt, genutzt. Der Insertionsvektor integriert als Ganzes durch Rekombination der Homologieflanken mit der Zielsequenz ([115] , [116]). Dieser Prozess wird von Rekombinasen wie den E- und T- Rekombinasen vermittelt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zielgenvektor handelte es sich um einen Insertionsvektor.

Die Rekombination mittels der beiden Rekombinasen E und T erhöht die Rekombinationsfrequenz ([114] ; [117]) im Gegensatz zu der Frequenz der Rekombination in embryonalen Stammzellen [118] erheblich, da die in den embryonalen Stammzellen auftretenden Rekombinasen nicht so effektiv arbeiten. Neben der Effizienz wird auch die Geschwindigkeit der Erzeugung einer transgenen Maus erhöht, da die aufwendige homologe Rekombination nicht in ES- Zellen durchgeführt werden muss. Der modifizierte BAC integriert in den ES- Zellen an einer beliebigen Stelle im Genom. Die daraus resultierende höhere Anzahl von Klonen, im Gegensatz zu bei einer homologen Rekombination

entstehenden Anzahl von Klonen, führt zu einem schnelleren Ablauf der ES- Zellkultur und der anschließenden Blastozysten Injektion.

1.5.2 Weitere Rekombinationssysteme

Zur Entfernung von zusätzlichen Sequenzen im bestehenden Mausmodel, welche man durch den modifizierten BAC eingebracht hat, eignet sich das Cre/loxP- und Flp/frt- System [119] . Die Systeme beruhen darauf, dass zwei gleich orientierte Erkennungssequenzen von einer Rekombinase erkannt werden und der dazwischenliegende DNS- Bereich herausgeschnitten wird. Hierbei werden keinerlei Hilfsproteine benötigt. In der Arbeit wurde das Flp/frt- System zum entfernen der Selektionskassette, welche in den Bakterien und in den ES- Zellen nötig ist (vgl. 4.1), verwendet

Die Flp- Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* [120] erkennt die 34 bp frt- Erkennungssequenz (**F**lp **r**ecombination **t**arget). Ein zwischen zwei gleich gerichteten Erkennungssequenzen liegendes Zielgen wird durch die Flp- Rekombinase ausgeschnitten und ein zwischen zwei unterschiedlich orientierten Erkennungssequenzen liegendes Zielgen invertiert.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Funktion und Regulation des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 zu analysieren. Hierfür wurde im ersten Teil der Arbeit eine BAC- transgene Maus erzeugt, die unter der Kontrolle des Foxp3- Promoters ein Reportergen (eYFP) exprimiert. Mittels dieser transgenen Maus erhält man die einzige Möglichkeit lebende Tregs *ex vivo* zu identifizieren und adaptiv zu transfieren ohne über den Marker CD25 sortieren zu müssen. Man erlang somit zum ersten Mal eine hochreine Foxp3⁺ T- Zell Population, nämlich auch die Foxp3⁺ CD25⁻ T- Zellen. So sollte in ersten Schritten das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktor Foxp3 über die Identifizierung des eYFP analysiert werden. Der Einsatz der BAC- transgenen DEREK- Maus, welche unter dem Foxp3- Promoter eGFP fusioniert mit dem Diphtheria Toxin Rezeptor exprimiert, ermöglicht zusätzlich zur Identifizierung, die Depletion Foxp3- exprimierender Zellen. Durch die Depletion der Tregs kann ihr Einfluss auf den Ablauf der Immunantwort weiter untersucht und weiter mögliche Eigenschaften der Tregs analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Stabilität der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 analysiert werden, wodurch erste Einblicke in die Regulation erlangt werden sollten. In einem ersten Schritt wurde die Stabilität der Foxp3- Expression *in vivo* ermittelt. Für eine nähere Analyse des Zusammenhangs der initialen bzw. der stabilen Expression und die Korrelation mit dem Methylierungsmuster der TSDR, sollten unterschiedlich kultivierte T- Zellen analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Korrelation des Methylierungszustandes der TSDR und der suppressorischen Eigenschaft der T- Zellen untersucht werden.

Weiterhin war ein Ziel der Arbeit, den Lokus des Foxp3- Gens und vor allem den Bereich der TSDR auf Besonderheiten, wie z.B. konservierte Regionen und Histon Modifikationen, sowie mögliche Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen, hin zu analysieren.

In einem dritten Teil der Arbeit stand die funktionelle Analyse der TSDR im Vordergrund. Es sollte ihre Bedeutung in Bezug auf die Expressionskontrolle des Foxp3- Gens untersucht werden. Bei dieser Analyse war die Frage, ob es sich bei dieser Region um einen eigenständigen Promoter oder um ein regulatives Element, z.B. ein Enhancer- Element handelt, entscheidend. Weitere Einblicke auf die Funktion der TSDR konnten durch Deletionsmutanten oder Methylierungsanalysen gewonnen werden.

2 Material

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analysequalität (p.a.) von den Firmen Becton, Dickinson and Company (BD), Miltenyi Biotec, Invitrogen, Merck, Renner, Roth, Falcon und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide stammen von den Firmen Amersham Biosciences, MWG Biotech, New England BioLabs, Promega und Roche. Nitrozellulosemembranen und Radiochemikalien wurden bei Amersham Biosciences erworben. Die Verwendung der Radiochemikalien erfolgte unter Berücksichtigung von Kalibrierungsdatum und Halbwertszeit.

2.1 Stammlösungen, Puffer und Medien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Lösungen, Puffer und Medien mit sterilem A. bidest angesetzt und die pH- Werte durch Verwendung von 2 N Natronlauge (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) eingestellt. Hitzestabile Lösungen und Puffer für DNS- Arbeiten wurden 20 Minuten, RNS- Lösungen eine Stunde autoklaviert.

2.1.1 Allgemeine Lösungen

PBS	133 mM Natriumchlorid (NaCl) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat auf Endvolumen mit A. bidest auffüllen, pH 7,2
SDS- Stammlösung (10%)	1 g Natriumdodecylsulfat in 10 ml A. bidest lösen
Tris- HCl (pH 7,4)	1 M Tris zu ca. $\frac{3}{4}$ in 1 M HCl ansetzen, auffüllen
EDTA	0,5 M EDTA, Endvolumen mit A. bidest auffüllen, pH 8,0

2.2 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

Medien werden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert, hitzelabile Stoffe steril filtriert und den Medien nach Abkühlen auf 50 – 55 °C zugegeben. Zur Herstellung von LB- Platten wird LB-Medium vor der Sterilisation mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt. Nach dem Abkühlen des LB- Agars auf 50 – 55 °C werden gegebenenfalls Selektionsantibiotika zugegeben und die Platten gegossen.

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Ampicillin- Stammlösung	500 mg Ampicillin in 5 ml A. bidest lösen (100 mg/ml), pH 7,4; steril filtrieren, Aliquots bei –20°C lagern, für Verwendung in Selektionsmedium 1:1000 Verdünnung
Kanamycin- Stammlösung	500 mg Kanamycin in 5 ml A. bidest lösen (100 mg/ml), pH 7,4; steril filtrieren, Aliquots bei –20 °C lagern, für Verwendung in Selektionsmedium 1:1000 Verdünnung
Chloramphenicol- Stammlösung	Stocklösung 34 mg/ml in EtOH abs. lösen; Aliquots bei –20 °C lagern; für Verwendung in Selektionsmedium 12,5µg/ml (1:2720)
LB- Medium (pH 7,4)	10 Kapseln (fertig von Invitrogen) ad 0,5 Liter mit A. bidest
LB- Agarplatten	zu LB- Medium 1,5% (w/v) Agar geben, autoklavieren, bei Bedarf Zugabe von Antibiotika [z.B. Ampicillin (100 µg/ml)], Nährböden in 10 cm- Kulturschalen gießen, Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C
SOC- Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe- Extrakt 10 mM NaCl

2,5 mM KCl

mit A. bidest auffüllen, 20 Minuten autoklavieren

Nach Abkühlen hinzufügen:

10 mM MgSO₄ (steril filtriert)

10 mM MgCl₂ (steril filtriert)

2.3 Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren

2.3.1 Präparation von DNS

STE- Puffer

50 mM Tris

50 mM EDTA

5 % (v/v) Triton X-100

8 % (v/v) Sucrose

auf Endvolumen mit A. bidest auffüllen, pH 8,0

Lysozym- Stammlösung

10 mg/ml in TE- Puffer, bei –20 °C lagern

TE- Puffer

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

auf Endvolumen mit A. bidest auffüllen, pH 8,0

autoklavieren

RNase- 2000- Stammlösung

100 mg RNase A in 49 ml TE- Puffer lösen, 1 ml

RNase T1 zugeben, 15 min kochen, Aliquots bei –20 °C lagern

Lysispuffer	100 mM Tris, pH 8,5 5 mM EDTA 0,2% (w/v) SDS 200 mM NaCl
Proteinase K- Lösung	2 % Proteinase K in A. bidest lösen, Aliquots bei -20 °C lagern
Neutralisationslösung	3 M Kaliumacetat pH Wert 5,5 (mit Eisessig einstellen) unbedingt bei 4 °C lagern
Resuspensionslösung	50mM Tris 10mM EDTA pH Wert 8,0 (mit HCl einstellen) unbedingt bei 4 °C lagern
Lysislösung (BAC)	200nM NaOH 1 % SDS
Elutionspuffer ChIP	1 % SDS 0,1 M NaHCO ₃ immer frisch ansetzen, da NaHCO ₃ zerfällt

2.3.2 Gelelektrophorese

TAE- Puffer (20x)	1,8 M Tris 1,8 M Eisessig 50 mM EDTA Stocklösung 1x, auf 0,5x Laufpuffer mit A. bidest verdünnen
-------------------	---

DNS- Probenpuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerol
Orange G- Probenpuffer (10x)	50 % Glycerin 10 mM Tris pH 7,5 10 mg/ml Orange G (SIGMA)
Ethidiumbromid- Stammlösung	1 % (w/v) Ethidiumbromid lichtgeschützt bei 4 °C lagern
1 kb Standard	Aliquot (50 µg) 100 µl DNS- Probenpuffer (6x) 350 µl TAE- Puffer

2.3.3 Transfer von Nukleinsäuren

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierungslösung	0,25 M HCl
DNS- Transferlösung	0,25 M NaOH 1,5 M NaCl
SSC (20x) (pH 7,5)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
Heringsperma- DNS	zur Denaturierung 5 min kochen und auf Eis abkühlen, bei –20 °C lagern

Hybridisierungslösung DNS	50% Formamid (deionisiert)
	5x SSC
	5x Denhardts Reagenz
	0,5% (w/v) SDS
	50 µg/ml Heringssperma- DNS (sonifiziert; Roche)

2.4 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Alle Medien und Lösungen, sowie A. bidest sind zellkulturgetestet. Selbst anzusetzende Lösungen wurden autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Kulturmedien werden bei Invitrogen gekauft.

2.4.1 Kultivierung

Normalmedium (10% Serum)	500 ml RPMI oder IMDM
	5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
	50 ml steril filtriertes fötales Kälberserum
	0,5 ml β -Mercaptoethanol (0,1 mM)
	5 ml Penicillin- Streptomycin (100 x)
	2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml)
	12,5 ml Hepes (1 M)
	bei 4 °C lagern, ca. einen Monat haltbar
Penicillin/Streptomycin- Stammlösung (100x)	0,6 % (w/v) Penicillin (10.000 Einheiten/ml)
	1 % (w/v) Streptomycinsulfat (10.000 Einheiten/ml)
	in Puck'scher Saline, pH 8,2; steril filtrieren
	bei 4 °C lagern
Gentamycin- Stammlösung	10 mg/ml Stammlösung
	Bei 4 °C lagern

Trypsin- Lösung	400 ml autoklaviertes PBS 100 ml autoklavierte EDTA- Lösung (1,85 g/l) 5 ml zellkulturgetestetes Trypsin (10x) 5 ml zellkulturgetestetes Hühnerserum bei -20 °C lagern, nach dem Auftauen bei 4 °C
β-Mercaptoethanol (0,1 mM)	14,1 ml steriles PBS 0,1 ml β-Mercaptoethanol- Stammlösung steril filtrieren, bei -20 °C lagern
Einfrier- Medium (2x)	17,5 ml Normalmedium 5 ml DMSO 2,5 ml fötales Kälberserum bei -20 °C lagern bei Anwendung 1:1- Verdünnung mit Normalmedium
HBSS- Lösung	50 mM Hepes 10 mM KCl 12 mM Dextrose 280 mM NaCl 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ pH Wert 7,05 bei 4 °C lagern, steril filtrieren
Erylysepuffer	0,01 M KHCO ₃ 0,155 M NH ₄ Cl 0,1mM EDTA pH Wert 7,5
PBS/BSA	PBS mit 2 g/l BSA

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Klonierungsvektoren

Tabelle 1: Klonierungsvektoren, ausführliche Vektorkarten siehe Anhang

Name	Eigenschaft	Quelle/Referenz
pBluescript II SK (+/-)	Ampicillin- Resistenz, MCS, Blau- Weiß- Selektion, T7/T3- Promoteren	Stratagene
pGL3- Basic Vektor	Ampicillin- Resistenz; MCS, Luciferasegen, SV40 late poly (A)	Promega
pGL3- Promoter Vector	Ampicillin- Resistenz, MCS, Luciferasegen, SV 40 late poly (A), SV 40 Promoter	Promega
pRL- TK Vector	Ampicillin- Resistenz, HSV TK Promoter, Renilla Reportergen, SV 40 late Poly (A), T7 Promoter	Promega

2.5.2 Rekombinante Plasmide

Folgende nicht selbst hergestellte Plasmide wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit genutzt.

Tabelle 2: Verwendete rekombinante Plasmide

Name	Vektorgerüst	Passagier- DNS	Referenz
pBSK:frt-NEO/KAN-frt	pBluescript II SK (+/-)	frt-PGK-NEO/Kan-frt	M. Gierl; MDC, Berlin
pMCV1.4-GFP	pMCV1.4	eGFP Reportergen	H. Duong; DRFZ, Berlin
IRES-eYFPpA-l2neo	pSP73	eYFP Reportergen, loxP-PGK-NEO-loxP; IHRES-K11	M. Mohrs (SN Lake, USA)

2.5.3 Bakterielle, artifizielle Chromosomen (engl. Bacterial artificial chromosomes; BAC)

Alle in dieser Arbeit verwendeten BACs wurden vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum) bezogen und entstammen der Library Nummer 731.

Tabelle 3: Verwendete BACs

Bezeichnung	Referenz
RPCIB731D08143Q2	RZPD
RPCIB731H05147Q2	RZPD
RPCIB731H08362Q2	RZPD

2.5.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei den Firmen TIB MOLBIOL und Operon bestellt. Sie wurden lyophilisiert geliefert und anschließend in dem vom Hersteller empfohlenen Volumen A. bidest oder TE- Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5.4.1 Primer für PCR

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit für die PCR verwendeten Primer

Name	Länge (bp)	Sequenz 5'→3'	Bindungsstelle	Orientierung
5' Fragment hin	24	GATCGGTACCCAGCAAAGACTATG	homologe Region FoxP3	Sinn
5' Fragment rück	24	GATCCCATGGGGTTCTTGTCAGAG	homologe Region FoxP3	Gegensinn
3' Fragment hin	24	GATCGGATCCAAGCCTATGGCTCC	homologe Region FoxP3	Sinn
3' Fragment rück	24	GATCACTAGTCCACAGTAAAGGTC	homologe Region FoxP3	Gegensinn
Prom Foxp3-5'	28	GATCGGTACCTTGTCCTCCAGGAGAGCGGG	Intron 1 Start	Sinn

			TSDR	
Prom Foxp3-3`	32	GATCCTCGAGGGGATAACAGTGGAATGG AGTC	Intron 2 ATG Foxp3	Gegensinn
FoxP3AS1XmaI	30	GATCCCCGGGCCCATATGGCTGGACCAT GG	Intron 1 Ende TSDR	Gegensinn
FoxP3S2XmaI	30	GATCCCCGGGTAAAGCCAATATAGTGGA AA	Intron 1 Ende TSDR	Sinn
FoxP3AS2XhoI	31	GATCCTCGAGCTTGGATGGAGGAGATGA GAG	Intron 1 Start Exon -1	Gegensinn
CN3neu_fow	20	GGCGTTCCTGTTTGACTGTT	konservierter Bereich TSDR	Sinn
CN3neu_rev	20	GGACGTCACCTACCACATCC	konservierter Bereich TSDR	Gegensinn
P1fowdel	28	GATCGGTACCAAGTTGTCCCAGGAGAGC	Start TSDR	Sinn
P1143revdel	28	GATCCCCGGGCATATGGCTGGACCATGG	Ende TSDR	Gegensinn
P285fowdel	28	GATCGGTACCAATGGAGCTCAGGAGGGA	erste Deletion TSDR	Sinn
P637fowdel	28	GATCGGTACCTAGCCAGATGGACGTCAC	zweite Deletion TSDR	Sinn
P894fowdel	28	GATAGGTACCGTCCCAGAAACAACCTCC	dritte Deletion TSDR	Sinn

2.5.4.2 Primer für Auftragssequenzierungen

Neben den Standardprimern T7 und T3 wurden individuelle Primer für die Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA verwendet. Diese Startermoleküle wurden direkt von der Firma AGOWA synthetisiert.

Tabelle 5: Startermoleküle für Auftragssequenzierungen

Name	Orientierung	Bindungsstelle	Sequenz
Int_hin	Sinn	Neo/Kan- Kasette	5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAGAC
Int_rück	Gegensinn	Neo/Kan- Kasette	5'-CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGC

Die Orientierungen beziehen sich auf die kodierende Region von eYFP in den jeweiligen Vektoren.

2.6 Größenstandard für Agarose- Gelelektrophorese

Tabelle 6: verwendete Nukleinsäure- Größenstandards

Verwendete DNS- Größenstandards	Fragmentgrößen (kb)
1 kb DNS- Leiter (Invitrogen)	12,216; 11,198; 10,180; 9,162; 8,144; 7,126; 6,108; 5,090; 4,072; 3,054; 2,036; 1,636; 1,018; 0,517; 0,506; 0,396; 0,344; 0,298; 0,220; 0,201; 0,154; 0,134

2.7 Bakterienstämme

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendeter Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Eigenschaft	Referenz
XL I blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^r 12,5 µg/ml)].	Plasmidvermehrung	Stratagene
DH10B	F- <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>araD139</i> ; Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	elektrokompetent; Plasmidvermehrung	Invitrogen
EL250	DH10B [<i>λcI857(cro-bioA)</i> <> <i>araC</i> -P _{BAD} <i>flpe</i>]	Hitzeinduzierte Rekombination	[121]

2.8 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Referenz
RLM-11	murine T- Zelllinie (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ J11d) heterogeneous	DennisY. Loh, Washington University School of Medicine, St. Louis.
EL4	murine T- Zelllinie, C57BL/6 Hintergrund	[122]
3DO	murine T- Zell Hybridoma, Ovalbumin-spezifisch, BALB/C Hintergrund	[123]
DO11-10	murines T- Zell Hybridoma, Ovalbumin spezifisch, Antigen I-Ad, IgG, BALB/C Hintergrund	[124]

2.9 Antikörper und Fluorochrome

Die in der Tabelle aufgeführten Antikörper gegen murine Antigenewurden für die Sortierung von Zellen und für die Durchflusszytometrie verwendet. Eingesetzte Fluorochrome sind in Tabelle 2-9 dargestellt.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Herkunft
CD4	GK1.5	Ratte	IgG2b	Deutsches Rheuma- Forschungszentrum (DRFZ), Berlin
CD4	L3T4	Ratte	IgG2b	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25	PC61.5	Ratte	IgG1	Becton Dickinson, Heidelberg
CD62L	MEL-14	Ratte	IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg
Foxp3	FJK-16s	Ratte	IgG2a	eBioscience, San Diego, USA

Tabelle 10: Eingesetzte Fluorochrome und Farbstoffe

Fluoreszenzkonjugat bzw. Farbstoff	Extinktionsmaximum (λ in nm)	Emissionsmaximum (λ in nm)
APC (Allophycocyanin)	650	660
Cy5 (Indodicarbocyanin)	650	670
FITC (Fluorescein- Isothiozyanat)	495	519
PE (R- Phycoerythrin)	480; 565	613
PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	490	675
PI (Propidium Iodid)	550	650

2.10 Reagenzien- Sätze (Kits)

- | | |
|---|---------------------|
| • ECL+Plus | Amersham |
| • NEBlot [®] Phototope [®] Kit | New England Biolabs |
| • Phototope [®] - Star Detection Kit | New England Biolabs |
| • QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit (50) | Qiagen |
| • Endofree [®] Plasmid Maxi Kit 10 | Qiagen |
| • QIAquick [®] Gel Extraction Kit 50 | Qiagen |
| • Qiaprep [®] Spin Miniprep Kit 50 | Qiagen |
| • DNeasy [®] Tissue Kit (50) | Qiagen |
| • RNeasy [®] Mini Kit (50) | Qiagen |
| • LightCycler [®] FastStart DNA Master YBR Green I | Roche |
| • Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit | Upstate |
| • Foxp3 Staining Kit | eBioscience |
| • Nucleofection [™] Protocol | Amara |

2.11 Allgemeine Labormaterialien

- Faltenfilter, Schleicher & Schuell
- Hybond- ECL Nitrozellulose Membran, Amersham
- Mikroreaktionsgefäße 0,25 – 2 ml, Eppendorf
- Parafilm „M“, American National Can
- Pipettierspitzen, Sarstedt
- Röntgenfilme X-OMAT AR, Kodak
- Röntgenfilm X-Ray, Amersham
- 15/50 ml Röhrchen, Sarstedt und Falcon
- Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm, Schleicher & Schuell
- Whatman 3mm- Papier GB 002, Schleicher & Schuell
- Zellkultur- Schalen, Nunc oder Corning Costar
- Einmal- Spritzen und -Kanülen B. Braun Melsungen AG
- Deckgläser, 24 x 50 mm, Menzel- Gläser
- Neubauer Zählkammer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
- Objektträger, 76 x 26 mm R. Langenbrinck
- Prä- Separationsfilter, Miltenyi Biotech GmbH
- Rundsieb Rotilabo®, Carl Roth GmbH & Co. KG
- Zellsieb (70 µm Nylon), BD Falcon™

2.12 Fertige Lösungen

- Chloroform, Merck
- DMSO, Merck
- Ethanol, Serva
- FCS, Invitrogen (HeLa) bzw. Sigma (HM-1)
- Formaldehyd 37%, Merck
- Glycerin, SIGMA
- Methanol, Serva
- Roti- Phores (10x), Roth
- Isopropanol, Merck

2.13 Geräte

- autoMACS® Miltenyi, BiotechGmbH
- Durchflusszytometer (FACSCalibur®, FACSDIVA®), Becton Dickinson
- Elektroporationsapparatur Gene Pulser, Bio-Rad
- Entwicklermaschine, AGFA Curix 60
- Feinwaage, Faust
- Gelkammer, peqlab Biotechnologie GmbH
- Handmonitor LB 1210 B, Berthold
- ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech (UV- Apparatur für Ethidiumbromid- Agarosegele)
- Inkubator (für die Zellen), Binder
- Inkubator (für die Bakterien), Heraeus
- Kolbenhubpipette Pipetman (20; 200; 1000 µl), Gilson
- Kühltzentrifuge (Biofuge fresco), Heraeus
- Kühltzentrifuge Multifuge 1.0R, Heraeus
- Lightcycler 1.0, Roche Applied Science
- Luminometer, Becton Dickinson
- MACS- Säulen, -Magneten, -Ständer, Miltenyi Biotech GmbH
- Mastercycler gradient, Eppendorf
- Mikrofuge 5417R, Eppendorf
- Mikroskop für Zellkultur, Helmut Hund GmbH
- Mini- Vortexer, VWR
- PCR- Maschine PTC-100™ Programmable Thermal Controller, Biozym
- Pipettierhilfe vac- petus, Faust
- Schüttler G25, Heraeus
- Spannungsgerät Electrophoresis Powersupply EPS 301, Amersham
- Spektralphotometer Nano Drop, Tecan
- Thermomixer comfort, Eppendorf
- Ultraschallspitze Sonifer B-12, Branson
- Ultrazentrifuge RC 5B Plus, Sorvall
- UV- Handlampe Bachhoffer HL 6M, 302 nm
- UV- Stratalinker 2400, Stratagene
- Waage Sac 51, Scaltec
- Wasserbad MT, mgw Lauda

2.14 Versuchstiere

Es wurden ausschließlich Mäuse als Versuchstiere bzw. zur Organentnahme verwendet. Alle Mäuse wurden unter spezifisch Pathogen- freien (specific pathogen free, SPF) Bedingungen gezüchtet. Für die Experimente wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen verwendet. Die Wildtyp- (WT) Stämme BALB/c und C57BL/6 wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin) bezogen. Die transgenen DEREK- Mäuse wurden an der Forschungsanstalt für experimentelle Medizin (FEM, Berlin) gezüchtet.

3 Methoden

3.1 DNS- Präparation

3.1.1 Analytische Plasmidisolierung aus Bakterien (Minipräparation)

Diese Methode erlaubt eine schnelle Isolierung von Plasmid- DNS aus Bakterien zur Charakterisierung rekombinanter Klone beispielsweise durch eine Testspaltungen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen oder durch eine Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode [125] .

Die Lysis der Bakterien beruht hierbei auf einer Kombination aus Lysozym, welches in der Bakterienzellwand das Polysaccharidgerüst des Peptidoglycans spaltet, und dem nicht- ionischen Detergenz Triton-X-100. Hierfür wurde der Reagenziensatz Qiaprep MINIprep 50 (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Je nach Ausbeute (10-20 µg) und in Abhängigkeit von ihrer weiteren Verwendung wurde die DNS in 25-50 µl A. bidest oder TE- Puffer (pH 8,0) aufgenommen und wurde bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

3.1.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien (Midipräparation)

Größere Mengen Plasmid- DNS mit hohem Reinheitsgrad wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie gewonnen. Hierfür wurde der Reagenziensatz Qiagen Plasmid Midi Kit 50 (QIAGEN) verwendet. Es handelt sich bei dieser Methode um eine weiterentwickelte Technik der alkalischen Lyse [126] . Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Je nach Ausbeute (100-200 µg bei „high copy- Plasmiden“ und einem Kulturvolumen von 50 ml) und in Abhängigkeit von ihrer weiteren Verwendung wurde die Plasmid- DNS in 50-100 µl A. bidest oder TE- Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

3.1.3 Präparative, endotoxinfreie Plasmidisolierung aus Bakterien (Maxipräparation)

Die für die Transfektion der Zellen benötigten großen Mengen an Plasmid- DNS wurden mit Hilfe des QIAgen EndoFree MaxiKits der Firma Qiagen gewonnen. Um zu gewährleisten, dass die zu transfizierende DNS frei von bakteriellen Endotoxinen ist, da diese zur Behinderung der Transfektion

führen können, wurden bei dieser Präparation ausschließlich Einmal- Plastikpipetten verwendet und entscheidende Schritte unter der Sterilbank durchgeführt.

3 ml LB- Medium, versetzt mit einem geeigneten Antibiotikum, wurden mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienklons inokuliert (Vorkultur) und üN, bei 225 UpM und 37 °C (Schüttler G25, Heraeus) inkubiert. 100 ml bzw. 250 ml mit Antibiotikum versetztem LB- Medium wurden mit 0,2 ml bzw. 0,5 ml der Vorkultur angeimpft und ebenfalls üN, bei 225 UpM und 37 °C (Schüttler G25, Heraeus) inkubiert.

Die Präparation erfolgte über Anionenaustausch- Säulen (QIAgen- Tip 500) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Plasmid- DNS wurde in 100 µl endotoxinfreiem TE- Puffer gelöst. Die Plasmid- DNS- Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.4 BAC- DNS- Isolierung

Eine Einzelkolonie transformierter Bakterien wurde in 2 ml LB- Medium mit geeignetem Antibiotikum bei 37 °C und 225 UpM (Schüttler G25, Heraeus) üN inkubiert. Die 5 ml Kultur wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, die Bakterien durch Zentrifugation (1 min, 10x4 g, RT, Heraeus Megafuge1.0R) sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Bakteriensediment wurde in 300 µl Resuspensionslösung resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Lysislösung zugegeben und die Suspension durch Invertieren gemischt. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT wurden 300 µl der Neutralisationslösung zugefügt und die Suspension wiederum durch invertieren gemischt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 24x4g, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco) bei dem sich ein Sediment aus Zellresten und anhaftender genomischer DNS bildet, welches mit einer sterilen Kanüle entfernt wurde. Durch Zugabe von 670 µl Isopropanol wurde die BAC- DNS im Überstand gefällt und durch anschließende Zentrifugation (15 min, 24x4 g, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 24x4g, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco). Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das Sediment 10 min bei RT luftgetrocknet. Das Präzipitat wurde in 50 µl TE- Puffer gelöst. Die so aufgereinigte BAC- DNS kann bei 4 °C gelagert werden. Um RNS freie BAC- DNS zu erhalten, kann der TE- Puffer mit RNase A versetzt werden (1% (v/v), pH 8.0).

3.1.5 Isolierung genomischer DNS aus Kulturzellen

Für die Isolierung großer Mengen genomischer DNS aus murinen Zellen wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden, um alle Mediumreste zu entfernen, zweimal mit PBS gewaschen. Auf 200 μ l PBS wurden dann eine Mischung aus 200 μ l Lysispuffer, 20 μ l Proteinase K (20 mg/ml) und 4 μ l RNase A (100mg/ml) pipettiert. Die Suspension wurde für mindestens 10 min bei 70 °C inkubiert, und anschließend wurden 200 μ l absoluter Alkohol zugefügt und die Suspension auf einem Vortexer (Mini Vortexer, VWR) gemischt. Durch die Zugabe von 1,05 ml Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wurde die gefällte genomische DNS als weißer Faden sichtbar. Dieser DNS- Faden wurde mit Hilfe einer umgebogenen 1 ml Spitze einer 1 ml Kolbenhubpipette in ein neues Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und zweimal mit 70% (v/v) Alkohol gewaschen. Anschließend wurde die luftgetrocknete DNS- Flocke in 100 μ l TE- Puffer aufgenommen. Zum Lösen der Flocke wurde der Ansatz zu erst für 1 h bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 1 h bei 55 °C im Schüttelwasserbad. Die genomische DNS- Lösung ist bei 4 °C lagerbar.

3.1.6 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

DNS- Fragmente verschiedener Länge, z.B. nach einer Spaltung durch Restriktionsendonukleasen (3.8.1), wurden mittels einer präparativen gelelektrophoretische Auftrennung (3.7.1) größenfraktioniert und anschließend unter UV- Licht aus dem Agarosegel mit Hilfe einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Es wurde langwellige UV- Strahlung (302 nm) eingesetzt, da DNS im Bereich ihres Absorptionsmaximums (260 nm) geschädigt wird. Die Isolation des gewünschten DNS- Fragmentes aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Reagenziensatzes QIAquick Gel Extraction Kit oder für Fragmente über 10 kb mit dem QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit (beide Qiagen, Hilden) und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht dabei auf der hohen Affinität von DNS zu der Silikatmatrix einer Zentrifugationssäule oder zu dem Zusatzstoff QIAEXII, welcher DNS- bindende Silikate beinhaltet. Die aufgereinigte DNS ist bei –20 °C lagerbar.

3.1.7 Natriumacetat- Fällung von DNS

Zur Konzentrierung und Umpufferung von DNS wurde die Tatsache genutzt, dass Nukleinsäuren bei der Zugabe von Natrium- oder Ammoniumionen und Ethanol als Kationen- DNS- Salze ausfallen [127] .

Zur DNS- Lösung wurden 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 2,5 Vol. eiskalter Ethanol abs. gegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und die DNS 15 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Durch Zentrifugation (10 min, $24\times 4\text{ g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Heraeus Biofuge fresco) wurde die DNS sedimentiert, der Überstand wurde dekantiert und das Sediment zur Entfernung der Salze mit $400\text{ }\mu\text{l}$ 70% (v/v) Ethanol gewaschen (10 min, $24\times 4\text{ g}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Heraeus Biofuge fresco), so dass das zur Fällung verwendete Salz aus dem DNS- Präzipitat ausgewaschen wird.

Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Sediment an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen TE –Puffer oder A. bidest gelöst. Diese Methode ist für eine Fällung von DNS und RNS in den meisten Fällen anwendbar, eignet sich jedoch nicht bei hohen Phosphatkonzentrationen oder zur Abtrennung von Nukleotiden.

3.1.8 RNS- Präparation

Um den Abbau der RNS durch endogene und exogene RNasen zu vermeiden, müssen besondere Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden. So wurden vor und während der Präparation alle Geräte, Arbeitsflächen und Handschuhe mit 96 % (v/v) Ethanol gereinigt. Die verwendeten Lösungen wurden 1 h autoklaviert, gegebenenfalls mit DEPC- H_2O angesetzt und die RNS bei allen Arbeitsschritten auf Eis gelagert.

3.1.9 RNS- Isolierung

Die RNS wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) wie im Protokoll beschrieben gewonnen. Es wurden 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die sedimentierte RNS wurde in $30\text{ }\mu\text{l}$ von Qiagen mitgelieferten RNase- freiem Wasser aufgenommen. Der empfohlene DNS- Verdau für eine höhere Reinheit der RNS wurde immer durchgeführt. Der DNS- Verdau erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen).

3.2 Polymerase- Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)

Die Polymerase- Kettenreaktion ist ein Verfahren zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung von DNS- Fragmenten [128] . Aus einem bekannten DNS- Bereich werden zwei Oligonukleotid- Primer abgeleitet, die an einer denaturierten, einzelsträngigen Matrizen- DNS in entgegengesetzter

Orientierung an die beiden DNS- Stränge binden. Ausgehend von den 3'- Enden dieser beiden Primer synthetisiert die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende hitzestabile *Taq*- DNS- Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt), nach Vorgabe der DNS- Matrizen zwei neue komplementäre DNS- Einzelstränge, die nach erneuter Denaturierung und Primeranlagerung selbst als Matrize fungieren. Als Alternative zur *Taq*- Polymerase wird die *Pwo*- Polymerase (Pqlab, Erlangen) aus dem Tiefsee- Bakterium *Pyrococcus woesei* oder die Kombinationspolymerase bestehend aus der *Taq*- und *Tgo*- Polymerase (aus *Thermococcus gorgonariusrecombinant*, Roche, Penzberg) verwendet. Die *Pwo*- Polymerase, sowie die Kombination der beiden Polymerasen sind aufgrund ihrer erhöhten Temperaturtoleranz in der Lage, G/C- reiche Abschnitte zu amplifizieren. Außerdem weisen sie aufgrund einer 3'- 5'- fehlerkorrigierenden Aktivität eine geringere Fehlerrate auf.

Durch 35-40 fache Wiederholung des Zyklus bestehend aus Denaturierung der DNS- Doppelstränge, Anlagerung der Primer und DNS- Synthese wird eine exponentielle Amplifikation der gewünschten Sequenz bewirkt. Eine anschließende, verlängerte Synthesephase ermöglicht die Verlängerung unvollständig vervielfältigter Stränge. Kontaminierende Fremd- DNS, die ebenfalls als Matrize dienen könnte, wird durch Mitführen einer Kontrollreaktion ohne Matrizen- DNS identifiziert. Eine Agarose- Gelelektrophorese mit einem Aliquot des nativen PCR- Produktes (vgl. 3.7.1) gab Aufschluss über den Erfolg der durchgeführten PCR.

Bei der Etablierung eines PCR- Programms werden $MgCl_2$ - Konzentration, Primeranlagerungstemperatur, Syntheszeit und Anzahl der Reaktionszyklen optimiert. Gegebenfalls kann es besonders bei hohem GC- Gehalt der Matrizen- DNS notwendig sein, PCR- Verstärker wie Glycerin oder DMSO zu verwenden, welche die Stabilität der Polymerase oder die Löslichkeit der DNS erhöhen.

Die Temperaturen der einzelnen Zyklen wurden mittels eines programmierbaren Thermozyklers (Biozym MJ Research PTC-100, MWG AG Biotech) oder eines Gradientencyclers (Mastercycler gradient, Eppendorf) gesteuert. Bei der PCR- Reaktion wurde der Reaktionsansatz wie beschrieben zusammen pipettiert und nicht, wie früher üblich, mit 50 μ l Mineralöl (Sigma) überschichtet, da die Deckel der Cycler beheizbar sind.

3.2.1 Ableiten von PCR- Primeren

Primer für eine PCR haben üblicherweise eine Länge von 30 bp und enthalten eine zu den Enden des gewünschten DNS- Fragmentes komplementäre Sequenz. Dabei leitet sich ein Primer vom Sinnstrang („upstream primer“), der andere vom Gegensinnstrang („downstream primer“) ab. Gegebenenfalls bringen die Primer über ihr 5'- Ende eine Restriktionsschnittstelle in das PCR- Produkt mit ein, um

eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen (vgl. 3.8.5). Diese zusätzlichen Nukleotide hybridisieren nicht mit der DNS- Matrize. Das Verhältnis von G/C- Gehalt zu A/T- Gehalt in einem Primer liegt idealerweise bei 1:1; die Schmelztemperatur eines PCR- Primer- Paares, der T_m - Wert, sollte vergleichbar sein und zwischen 55 bis 65°C liegen. Der T_m - Wert ergibt sich für Primer von mehr als 14 Nukleotiden Länge aus folgender Gleichung:

$$T_m \text{ in } [^{\circ}\text{C}] = 69.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{GC- Gehalt in } \%) - 650 / \text{Primerlänge}$$

Es ist darauf zu achten, dass sich am 3'- Ende eines PCR- Primers ein Nukleotid mit einer Cytosin- oder Guaninbase befindet. Die drei Wasserstoffbrückenbindungen, die diese Nukleotide zu ihrem komplementären Partner ausbilden, bewirken eine festere Bindung des DNS- Doppelstranges, wodurch die DNS- Polymerase einen geeigneten Synthesestart vorfindet.

3.3 Typischer PCR- Ansatz für die Taq- Polymerase

Tabelle 11: PCR- Ansatz und Programm mit der Taq- Polymerase

PCR- Ansatz (25 µl):	PCR- Programm:			
2,5 µl 10x Taq- Puffer	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1,5 µl MgCl ₂ [25mM]	1	96 °C	5 min	1
0,5 µl Primer hin [10 µM]	2	94 °C	45 sec	35
0,5 µl Primer rück [10 µM]	3	62 °C	30 sec	
1 µl dNTPs [je 10 mM]	5	72 °C	je nach Produktgröße 1 kb = 1 min	
0,25 µl Taq- DNS- Polymerase	6	72 °C	10 min	1
1 µl DNS				
17,25 µl A. bidest				

3.3.1 Typischer PCR- Ansatz für die Taq- Polymerase und Tgo- Polymerase

Tabelle 12: PCR- Ansatz und Programm mit der Taq- und Tgo- Polymerase

PCR- Ansatz (50 µl):	PCR- Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
5 µl 10x High- Puffer				
1 µl Primer hin [20 pmol]	1	96 °C	5 min	1
1 µl Primer rück [20 pmol]	2	94 °C	30 sec	35
1 µl dNTPs [je 10 mM]	3	62 °C	45 sec	
0,75 µl High- DNS- Polymerase	4	72 °C	vgl. 3.3.2	
2 µl DNS	5	72 °C	10 min	1
30,25 µl A. bidest				

3.3.2 Typischer PCR- Ansatz für die Pwo- Polymerase

Tabelle 13: PCR- Ansatz und Programm mit der Pwo- Polymerase

PCR- Ansatz (50 µl):	PCR- Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
5 µl 10x Reaktionspuffer inkomplett				
0,75 µl Primer hin [10 µM]	1	94 °C	2 min	1
0,75 µl Primer rück [10 µM]	2	94 °C	30 sec	35
1 µl dNTPs [je 10 mM]	3	58 °C	45 sec	
2,5 µl Pwo- DNS- Polymerase	4	72 °C	2 min	
0,4-1 µl Plasmid- DNS [100-250 ng]	5	72 °C	10 min	1
4-5 µl MgSO ₄ [2-2,5 mM]				
34-35,6 µl A. bidest				

3.4 Herstellung von cDNS mit RNS- Matrize für die RTQ- PCR

Für die Gewinnung von cDNS wurden 1 µg RNS in einem PCR (vgl. 3.2) ähnlichen Ansatz umgeschrieben. RNS und Oligo d(T)s werden nachdem sie zusammen pipettiert wurden, für 10 min bei 70 °C in der PCR- Maschine aneinander gelagert. Die Synthese der cDNS erfolgte für 1 h bei 42 °C, anschließend erfolgt ein Inaktivierungsschritt für 5 min bei 94 °C. Der Ansatz für die Synthese der cDNS setzt sich aus den in Tabelle 3-4 dargestellten Komponenten zusammen.

Tabelle 14: Ansatz für die cDNS Synthese

cDNS Ansatz (20µl)	Mengen
RNS [1µg]	10,5 µl
d(T)12-18 [0,1mg/ml]	1 µl
5x RT Puffer	4 µl
NTP [2,5mM]	1 µl
DTT [0,1M]	2 µl
RNasin [40U/µl]	0,5 µl
Superscript [200U/µl]	1 µl

3.5 RTQ- PCR (engl. real time quantitative PCR)

Die RTQ- PCR ist eine schnelle und einfache Möglichkeit, die mRNS- oder DNS- Mengen in Proben quantitativ zu bestimmen. Die mRNS muss für diese Methode zuerst in cDNS umgeschrieben (vgl. 3.4) werden, um in einer RTQ- PCR analysiert zu werden. Die Methode der RTQ- PCR beruht darauf, dass durch die Amplifikation der Template- DNS immer größere Mengen des Farbstoffes SYBR Green (Roche Applied Science, Mannheim) anlagert wird. Große Mengen Template- DNS führen zu einem schneller detektierbaren Signal des SYBR Green als geringe Mengen von Template- DNS. Für den RTQ- PCR Ansatz wurde das LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) genutzt.

Tabelle 15: Ansatz einer RT- PCR Reaktion

RT- PCR Ansatz (20µl)	Mengen
DNS	4 µl
Lightcycler Mix {10 µl 1a in 1b}	2 µl
forward Primer [10 µM]	1 µl
reverse Primer [10 µM]	1 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,6 µl
DNase/RNase freies Wasser (Gibco)	10,4 µl

Die Ansätze wurden in LightCycler Kapillare überführt und abzentrifugiert (1 min, 2000 UpM, RT, Heraeus Biofuge fresco). Die Amplifikation erfolgte in Light Cycler Maschinen von Roche Applied Science und die Auswertung der erhaltenen Messwerte mit der Software Rel Quant (Roche Molecular Biochemicals).

3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.6.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Anhand der Absorption von UV- Licht lassen sich Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren bestimmen. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm (A_{260}) und das der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm (A_{280}).

Im Spektralphotometer (Beckman DU[®] 640, Krefeld) wurde die Absorption einer Nukleinsäurelösung in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm gegen TE- Puffer als Referenz gemessen. Nach dem Lambert- Beer'schen Gesetz entspricht eine Optische Dichte von 1 (OD1) bei 260 nm und bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml für DNS, 40 µg/ml für RNS und 35 µg/ml für Oligonukleotide.

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{OD}_{600} 1/1000$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für DNS zwischen

1,8 und 2,0 und bei RNS zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch UV- absorbierende Stoffe wie Proteine oder Phenole hin.

3.6.2 Konzentrationsabschätzung durch Agarose- Gelelektrophorese

Mit dieser Methode lassen sich sehr geringe Nukleinsäurekonzentrationen zwischen 1 ng und 100 ng abschätzen, die für eine photometrische Bestimmung zu niedrig sind. Die Konzentrationsbestimmung im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel erfolgte über einen Bandenintensitätsvergleich der Probe unbekannter Konzentration mit einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration. Da die Leuchtintensität des Ethidiumbromids direkt proportional zur DNS- Menge ist, besitzen Banden von gleicher Intensität die gleiche Menge an DNS- Fragmenten.

3.7 Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf dem Verhalten von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Da sie im gelösten Zustand bei neutralem pH- Wert aufgrund ihrer sauren Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie zur Anode. Dabei wirkt die Gelmatrix, die die Nukleinsäuren zu durchwandern haben, als molekulares Sieb, das große Nukleinsäure- Moleküle stärker zurückhält als kleine, sowie die Diffusion minimiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Moleküle ist somit näherungsweise umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molaren Masse, auf diese Weise wird eine Größenfraktionierung erreicht.

Im Agarosegel wurden Nukleinsäuren durch interkalierendes Ethidiumbromid detektiert. Ethidiumbromid ist ein aromatischer Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit UV- Licht fluoresziert. Durch zusätzliches Auftragen eines Größenstandards lässt sich die Größe der aufgetragenen Nukleinsäurefragmente bestimmen.

3.7.1 Native Agarose- Gelelektrophorese

Dieses Verfahren wurde zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNS- Fragmente verwendet. Die Agarosekonzentration der Gelmatrix bestimmt den Größenbereich, in dem die höchste Auflösung erreicht wird. Sie wurde den zu erwartenden Fragmentgrößen angepasst.

Tabelle 16: Auflösungsvermögen von Agarosegelen bei verschiedenen Agarosekonzentrationen

Fragmentgröße in kb:	0,05-0,6	0,15-2	0,3-10	0,5-20
Agarosekonz. in % (w/v):	2,0 %	1,5 %	0,7 %	0,5 %

Abhängig von Probenanzahl und erwünschter Trennstrecke werden kleine (11 bis 22 Proben, 8 x 11,5 cm, 50 ml) oder mittlere (20 bis 40 Proben, 12 x 14 cm, 100 ml) Gelträger ausgewählt. Die Agarose wird im Erlenmeyerkolben abgewogen, die entsprechende Menge Laufpuffer (1x TAE) zugegeben und die Lösung so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose komplett gelöst ist. Die auf etwa 50 °C abgekühlte gelartige Agarose wurde mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von etwa 0,6 µg/µl versetzt und in einen mit Kämmen bestückten Gelträger gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Kämmen entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer (1x TAE) gefüllte Kammer platziert. Die mit 1/5 Volumen 6x DNS- Ladepuffer versetzten Proben wurden in die Taschen pipettiert und mit 7– 9 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das im Gel enthaltene fluoreszierende Abbild der DNS- Fragmente mit Hilfe des UV- Transilluminators (Pharmacia Biotech Image Master[®] VDS) photographiert.

3.8 Enzymatische Modifikation und *in vitro*- Rekombination von DNS

3.8.1 Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen doppelsträngige, palindromischen Nukleotid- Abfolgen zwischen vier und acht Basenpaaren und schneiden meist innerhalb dieser Erkennungssequenz, wodurch ein ringförmiges DNS- Molekül linearisiert oder in definierte Fragmente zerlegt wird. Bei der Spaltung entstehen je nach verwendeter Restriktionsendonuklease glatte Doppelstrang- oder Einzelstrangenden mit 3'- oder 5'- Überhängen. Bei der Spaltung genomischer DNS muss darauf geachtet werden, dass keine methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen wie *ClaI*, *NotI*, *SalI* oder *SmaI* verwendet werden.

Die Zugabe von 0,5 µl RNaseA wirkt Verunreinigungen der DNS- Probe durch RNS entgegen.

3.8.1.1 Vollständige Spaltung von DNS

Zur vollständig Spaltungen von Plasmid- DNS wurden etwa 2 U Restriktionsendonuklease pro μg DNS eingesetzt. Analytische Spaltungen (50– 200 ng DNS) werden in einem Endvolumen von 10 μl durchgeführt, präparative Spaltungen nach Bedarf skaliert, wobei die eingesetzte Enzymmenge 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten darf. Entsprechend den Herstellerangaben werden Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten Puffersystemen bei angegebener Temperatur eingesetzt. Gleichzeitige Spaltung einer DNS- Probe mit mehreren Enzymen ist nur bei kompatiblen Pufferanforderungen möglich, ansonsten muss die Probe vor Behandlung mit jedem neuen Enzym umgepuffert werden (vgl. 3.1.7). Die Spaltung erfolgt für mindestens 1 h, bei großen Mengen an DNS auch ∞ . Viele Restriktionsendonukleasen können gemäß Herstellerangaben hitzeinaktiviert werden.

3.8.1.2 Vollständige Spaltung von genomischer DNS

Zur Analyse von genomischer DNS mittels Southern- Blot- Hybridisierung wurden für die Spaltung in einem Gesamtvolumen von 40 μl 12 μg DNS und 1,5 μl hochkonzentrierte Restriktionsendonukleasen (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, *AvaI* bzw. *HindIII*, Roche) eingesetzt. Die Spaltung erfolgte ∞ , am Morgen wurden noch einmal 0,5 μl Restriktionsendonuklease nachgeben und weitere 3 h verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde mittels eines 1% Ethidiumbromid- Agarosegels überprüft, es wurde 1/20 Vol. des Restriktionsansatzes aufgetragen.

3.8.2 Glätten überhängender einzelsträngiger 5'- DNS- Enden

Neben Restriktionsendonukleasen, die die Zielsequenzen glatt schneiden, also keine DNS- Einzelstrangüberhänge entstehen lassen, erzeugen andere Enzyme bei der Spaltung 3'- oder 5'- überhängende Enden. Bei Klonierungen unter Einsatz verschiedener Restriktionsendonukleasen sind diese entstehenden Enden oft nicht kompatibel. Für ein späteres Zusammenfügen solcher Fragmente ist es nötig, diese Überhänge zu glätten. Sollte ein 5'- überhängendes Ende aufgefüllt werden, geschah dies mit Hilfe des Klenow- Fragments der DNS- Polymerase I aus *E. coli*. 3'-überhängende Enden wurden mittels der Mung Bean- Polymerase abgebaut. Im Verlauf dieser Arbeit wurden 5'- und 3'- überhängende Enden geglättet.

Dem hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz (0,1–4 μg DNS) wurden 3 μl Restriktionspuffer (10x Puffer B oder H bzw. Mung Bean- Puffer, Roche) und 1 μl Klenow- bzw. Mung Bean- Polymerase (2 U/ μl)

zugesetzt. Bei dem Ansatz mit der Klenow- Polymerase wurden zusätzlich noch 1 µl dNTPs (2 mM/µl) zugefügt. Das Gesamtvolumen wurde bei beiden Ansätzen mit A. bidest auf 30 µl aufgefüllt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37 °C für 20 Minuten. Anschließend wurden die Enzyme bei 75 °C für 10 min inaktiviert.

3.8.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Weist der Vektor bei einer *in vitro*- Rekombination mit Passagier- DNS komplementäre überhängende Enden auf, muss verhindert werden, dass es zu einer Religation des linearisierten Vektorrückgrats kommt, da sonst bei einer Transformation nicht- rekombinante Klone auftreten. Dies wird durch Dephosphorylierung der Vektorenden mit der alkalischen Kälber- Phosphatase (engl. „Calf Alkaline Phosphatase“ (CIP), NewEngland Biolabs, Freiburg) oder der antarktischen Phosphatase (New England Biolabs) erreicht. Damit ist eine Verknüpfung des Vektors durch die T4- Ligase nur über die phosphorylierten 5'- Enden der Passagier- DNS möglich.

Die nach Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen über ein Gel aufgereinigte Vektor- DNS (vgl. 3.1.6) wurde mit 10 units, maximal jedoch 1/10 des Reaktionsvolumens, CIP versetzt; die optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch die Zugabe 1/10 Vol. von 10 x CIP- Puffer hergestellt. Nach 30 min Inkubation des Ansatzes im Brutschrank bei 37°C wurde, da die CIP sehr hitzelabil ist, erneut 10 units Enzym hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurde die CIP 20 min bei 75 °C im Wasserbad inaktiviert, um zusätzliche Dephosphorylierungen der Passagier- DNS im Ligationsansatz zu verhindern.

3.8.4 Ligation von DNS- Fragmenten

Mit Hilfe der T4- Ligase (Roche Applied Science) lassen sich intra- bzw. intermolekulare Verknüpfungen freier DNS- Enden durchführen. Die Ligation kann zwischen kohäsiven oder glatten DNS- Enden erfolgen. Die T4- Ligase verknüpft ATP- abhängig freie 5'- Phosphatgruppen mit freien 3'- Hydroxylgruppen von DNS- Molekülen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Die jeweiligen Stellen, an denen Vektor- und Passagier- DNS noch nicht verknüpft sind, werden nach der Transformation durch Reparaturenzyme des Bakteriums geschlossen.

Vektor- und Passagier- DNS wurden zur Ligation in einem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:6 eingesetzt, je nach Konzentration von Vektor- und Passagier- DNS, wobei das Reaktionsvolumen

zwecks häufiger Interaktionsereignisse zwischen den Reaktionspartnern mit 10 bis 15 µl möglichst gering gehalten wurde. Die DNS- Gesamtmenge sollte 100 ng nicht unterschreiten.

Der Ansatz aus Vektor- und Passagier- DNS, 10x Ligasepuffer (Roche Applied Science) und 1 bis 1,5 µl T4- Ligase (1 U/µl) wurde für 15 min bei RT bei kohäsiven, für 60 min bei RT bei glatten Enden und üN bei 16°C im Thermoschüttler inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass der 10x Ligasepuffer nur kurz aufgetaut wird, um einen Abbau des ATP zu vermeiden. Zur Kontrolle der Ligation wurde eine Reaktion mit Vektor- DNS und H₂O anstelle von Passagier- DNS durchgeführt.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden in dieser Arbeit sowohl Vektor, als auch Passagier- DNS über das Gel aufgereinigt eingesetzt. War eine Religation erwünscht, beispielsweise nach der Deletion einer Schnittstelle, wurde auf Dephosphorylierung verzichtet und das Reaktionsvolumen zur Vermeidung der Entstehung von Konkaternen erhöht.

3.8.5 Klonierung von PCR- Fragmenten

Zur Klonierung einer bestimmten DNS- Sequenz in einen Vektor und für die in dieser Arbeit vorgenommene Einführung von Punktmutationen bzw. Restriktionsendonukleasen- Schnittstellen eignet sich folgendes Verfahren am besten: Der gewünschte DNS- Abschnitt wird zunächst mittels PCR (vgl. 3.2) amplifiziert. Dabei wurden die Primer jeweils so gewählt, dass sie zum einem zur Einführung der gewünschten Veränderung führen, und zum anderem noch ausreichend komplementäre Sequenz besitzen, um zur sequenzspezifischen Hybridisierung mit der Matrizen- DNS zu führen. Das amplifizierte und dabei an seinen Enden modifizierte DNS- Fragment wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. 3.8.1) und in den Zielvektor einligiert (vgl. 3.8.4). Eine weitere Methode ist die Ligation von PCR- Produkten mit Hilfe der Topoisomerase (Invitrogen, Carlsbad, Californien). Hierfür wurden die bei einer PCR entstehenden Adenin- Überhänge genutzt. Das PCR- Produkt wurde in einen speziellen Plasmid, welcher dem Ligationskit (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) beiliegt, einkloniert und kann über eine Vielzahl von Restriktionsendonukleasen wieder ausgeschnitten werden.

3.8.6 Methylierung von DNS- Fragmenten

Mit der CpG Methylase M. *SssI* (New England Biolabs) können in der DNS auftretende CpG- Motive *in vitro* methyliert werden. Hierfür wurden die vom Hersteller mitgelieferten Komponenten nach den vorgegebenen Angaben zusammen gemischt und die DNS zugefügt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C im Heizblock (Eppendorf). Anschließend wurde die Methylase bei 65 °C für 20 min nach Herstellerangabe hitzeinaktiviert.

3.9 Transformation

E. coli Bakterien sind in seltenen Fällen in der Lage, DNS aus dem Kulturmedium durch Zellwand und –membran hindurch aufzunehmen (Transformation). Durch besondere Behandlung von *E. coli* Bakterien des Stamms TOP10 kann die Effizienz dieses Prozesses um ein Vielfaches gesteigert werden. Die Bakterien werden dann als (transformations-) kompetent bezeichnet. Experimentell wird dieser Vorgang dazu genutzt, Plasmid- DNS in größeren Mengen zu gewinnen oder bakterielle Proteinexpressionssysteme zu etablieren. Eine Retransformation liegt vor, wenn durch eine Midi-Präparation (vgl. 3.1.2) bereits aufgereinigte Plasmid- DNS zur Transformation weiterer Bakterien-Kulturen dient.

3.9.1 Herstellung transformationskompetenter, einfrierbarer Bakterien

Bei diesem Verfahren wird die Bakterienzellwand durch Behandlung mit CaCl_2 durchlässig gemacht [129]. Der entsprechende Bakterienstamm wurde auf einer ggf. antibiotikumhaltigen Agarplatte üN bei 37 °C kultiviert. Mit einer Einzelkolonie wurden 2,5 ml YT^{++} - Medium inokuliert und üN in einem Thermoschüttler (225 UpM, G25, Heraeus) bei 37 °C inkubiert. Mit 200 µl dieser üN- Kultur wurden 5 ml YT^{++} - Medium inokuliert und 1,5 h bei 37 °C geschüttelt (225 UpM, G25 Heraeus). Diese gesamte Vorkultur wurde zu 100 ml vorgewärmtem YT^{++} - Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,45 bis 0,55 bei 37°C im Thermoschüttler (225 UpM, G25 Heraeus) erneut inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 ml Röhrchen (Falcon, USA) verteilt, 5 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5.850 g, 4°C, 5 min, Heraeus Multifuge 3 S-R). Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums wurden die sedimentierten Bakterien im Kühllabor (4 °C) in jeweils 10 ml TFB I resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (5,850 g, 4 °C, 5 min, Beckman Ultrazentrifuge). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Bakteriensedimente im

Kühllabor in je 2 ml TFB II aufgenommen, die beiden Ansätze zusammengegeben und nach Aliquotierung von jeweils 200 µl Bakteriensuspension in einem 1,5 ml Schraubdeckelgefäß sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf diese Weise sind die kompetenten Bakterien mehrere Monate bei –70 °C lagerbar.

3.9.2 Durchführung der Transformation

Ein Aliquot eingefrorener Bakterien wird auf Eis aufgetaut, die frischen kompetenten Bakterien auf Eis gelagert. Nach der Zugabe der Plasmid- DNS (1 bis 100 ng) bzw. des Ligationsansatzes und vorsichtigem Durchmischen erfolgte eine 30 minütige Inkubation der Transformationsansätze auf Eis. In dieser Zeit adsorbiert die DNS an die bakterielle Zellwand. Ein anschließender Hitzeschock der Bakterien für 30 bis 90 sec bei 42 °C bewirkt die Aufnahme der DNS. Danach wurden die Bakterien sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Die Kultivierung der Bakterien beginnt zunächst in jeweils 250 µl SOC- Medium ohne Antibiotikum für 45 bis 60 min bei 37 °C im Thermoschüttler (225 UpM, G25 Heraeus). In dieser Zeit sollen sich die plasmidkodierte Resistenzeigenschaften der Bakterien ausbilden, welche eine Selektion transformierter Bakterien ermöglichen. Anschließend wurden 10 µl einer Bakterienkultur auf einem Selektionsnährboden mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (30 sec, RT, 13.000 UpM, Heraeus Biofuge fresco) und der Überstand wird bis auf ca. 50 µl dekantiert. Darin wurde das Bakteriensediment resuspendiert und auf einem weiteren Selektionsnährboden ausplattiert. Mit dem Deckel nach unten wurden die angeimpften und getrockneten Agarplatten üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.9.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Nur transformierte Bakterien, die das Plasmid mit kodiertem Resistenzgen aufgenommen haben, sind in der Lage, in Anwesenheit eines Selektionsantibiotikums, wie z.B. Ampicillin, zu wachsen. Dabei können Bakterien, welche rezirkularisierte Vektoren ohne die gewünschte einligierte Passagier- DNS aufgenommen haben, neben korrekten rekombinierten Klonen existieren. Zu einer Rezirkularisierung von Vektoren kommt es, wenn sie durch die CIP oder antarktische Phosphatase unzureichend dephosphoryliert wurden (vgl. 3.8.3). Der Anteil nicht- rekombinanter Klone wird mit Hilfe eines Selektionsnährbodens abgeschätzt, auf welchem mit dem Kontrollligationsansatz (vgl. 3.8.4) transformierte Bakterien ausplattiert wurden. Korrekt rekombinierte, nicht- und falsch rekombinierte (z.B. mehrfache Insertion der Passagier- DNS) Bakterienklone wurden durch analytische Plasmid-

Präparation (vgl. 3.1.1) und anschließende Restriktionsanalyse der gewonnenen DNS (vgl. 3.8.1) mit Hilfe einer Agarose- Gelelektrophorese (vgl. 3.7.1) identifiziert.

3.10 Elektroporation von Bakterien zur homologen Rekombination

Die Elektroporation ist eine weitere Methode, um Bakterien mit DNS zu transfizieren. Die Bakterien werden einem elektrischen Puls ausgesetzt, wodurch kurzzeitig Poren in der Membran entstehen, durch die exogene DNS in das Zytosol gelangen kann. Durch geeignete Selektionsbedingungen können Bakterien, welche die exogene DNS aufgenommen haben, angereichert werden.

3.10.1 Vorbereitung der zu transfizierenden DNS

Für die Elektroportion der Bakterien mit dem BAC (vgl. 3.10.2) war es erforderlich, saubere DNS zu gewinnen. Es wurde die in 3.1.4 beschriebene Methode angewendet. Die gewonnene BAC- DNS wurde für die Analyse der Reinheit mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut. Der Verdau wurde auf ein Agaroesgel aufgetragen. An Hand des Bandenmusters war die Reinheit der BAC- DNS bestimmbar. Die Banden, die in der Tasche hängen bleiben, weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. In diesem Fall musste die DNS entweder nochmals neu gewonnen oder sie konnte mittels der Natriumacetat- Fällung (vgl. 3.1.7) aufgereinigt werden.

Bei einem zweiten Elektroporationsschritt wurde nur ein kurzes DNS- Fragment elektroporiert, im Falle dieser Arbeit das Insert des Zielgenvektors. Das DNS- Fragment wurde durch Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt (vgl. 3.1.6).

3.10.2 Methode des ET- Klonierens

Die Methode des ET- Klonierens wurde von Muyers *et al.* im Jahre 1999 zum ersten Mal als eine Möglichkeit der schnellen, homologen Rekombination beschrieben [113] . Wesentlicher Bestandteil der Methode sind die aus einem Phagen stammenden Rekombinasen E und T, welche der Methode auch ihren Namen gaben. Diese beiden Rekombinasen wurden in dem E.coli Stamm EL250 unter einem hitzeinduzierten Promoter exprimiert. Dieses bedeutet, dass die Rekombinasen nur aktiv sind, wenn die Bakterien bei 37 °C gehalten werden. Die Rekombination kann somit sehr gezielt gesteuert werden. Die BACs wurden in dem Bakterienstamm DH10B gehalten, deswegen erfolgte zunächst eine

Elektroporation der BAC- DNS in den Bakterienstamm EL250. Die Bakterien mussten vor der Elektroporation noch elektrokompent gemacht werden. Hierfür wurden sie bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen, in 50 ml Gefäße überführt, danach 15 min bei 42 °C erhitzt (Aktivierung der Rekombinasen, bei der ersten Elektroporation nicht notwendig) und 10 min in Eiswasser abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (10 min, 10x2,5g, 4 °C, Hereaus Megafuge 1.0R). Die Bakterien wurden in 10 %igem kaltem Glycerin aufgenommen und ein zweites Mal abzentrifugiert (10 min, 10x4g, 4 °C, Hereaus Megafuge 1.0R). Nach diesem Schritt wurde wieder mit 10% igem Glycerin resuspendiert und bei 10x6g abzentrifugiert (10 min, 4 °C, Hereaus Megafuge 1.0R). Ein letzter Zentrifugationsschritt erfolgte bei 10x8g (10 min, 4 °C, Hereaus Megafuge 1.0R) ebenfalls in 10% igem Glycerin. Die Bakterien waren nach diesen Schritten elektrokompent und konnten mit der DNS vermischt werden. Die DNS wurde wie in 3.10.1 beschrieben aufgereinigt und mit den EL250 vermischt. Es wurden von den Bakterien 26 µl und von der BAC- DNS 0,5-1 µl eingesetzt. Die Suspension wurde in eine Küvette gegeben (1mm, Electroporation cuvette black, Thermo) und elektroporiert. Die Elektroporation wurde für 3,5 sec bei 25 µF, 200 µOhm und 1,8 kV durchgeführt. Die Zellen wurden im Anschluss unter der Sterilbank für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf 10 cm Kulturschalen mit Normalmedium verteilt. Die Suspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 32 °C unter Ampicillin- (Amp) und Chloramphenicol- (Cam) Selektionsdruck hochgezogen. Der Selektionsdruck garantierte, dass nur Bakterien, die den BAC enthalten hochgezogen wurden. Für die anschließende Elektroporation des Inserts wurden BAC- enthaltende EL250- Bakterien, wie für die erste Elektroporation beschrieben, elektrokompent gemacht. 100 ng des aufgereinigten Inserts (vgl. 3.10.1) wurden mit den Bakterien vermischt und wie beschrieben elektroporiert. Der Selektionsdruck erfolgte in diesem Schritt mit den Antibiotika Kanamycin (Kan) und Chloramphenicol. Anschließend wurden die BACs mit dem Insert für bessere Wachstumsbedingungen wieder in DH10B Bakterien eingeführt. Auch in diesem Fall erfolgte die Elektroporation wie beschrieben und der Selektionsdruck wieder mit den Antibiotika Cam und Kan.

3.11 Auftragsarbeiten

3.11.1 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA durchgeführt. Die DNS wurde hierzu in A. bidest gelöst versandt. Für die Sequenzierung von GC- reichen Abschnitten mussten spezielle Reagenssätze, wie z. B. das „GTP-Kit“, verwendet werden.

3.11.2 Methylierungsanalyse

Für die Methylierungsanalyse wurden aus den *ex vivo* isolierten und kultivierten Zellen die genomische DNS mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit (50) (Qiagen) gewonnen. Die Methylierungsanalyse der DNS wurde bei der Firma Epiontis (Berlin) durchgeführt. Für diese Analyse waren eine Bi-Sulfitreaktion und eine Sequenzanalyse der gewünschten Bereiche von Nöten. Bei der Bi-Sulfitierung der DNS werden alle unmethylierten Cytosin durch eine hydrolytische Deaminierung in Uracil umgewandelt. Durch die anschließende Sequenzierung der gewünschten Region können nach einer erfolgreichen Bi-Sulfitierung methylierte Cytosine von unmethylierten Cytosinen unterschieden werden, da nur unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird.

3.12 Transfer von Nukleinsäuren

Der Transfer von Nukleinsäuren auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran und ihre damit verbundene Immobilisierung ermöglicht die Detektion spezifischer Nukleinsäuremoleküle nach Anlagerung einer z.B. radioaktiv oder Biotin- markierten DNS- Sonde. Nylonmembranen haben gegenüber Nitrozellulosemembranen den Vorteil höherer Bindungskapazität und Haltbarkeit. Dies ermöglicht mehrmaliges Hybridisieren einer Membran, beispielsweise mit verschiedenen DNS-Sonden.

Mittels Kapillarkräften wurden einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle auf Nylonmembranen übertragen. Anschließend wurden sie mit Hilfe von Hitze (15 min, 120 °C) und/oder UV-Kreuzvernetzung auf der Membran immobilisiert.

3.12.1 Transfer von DNS (Southern- Blot)

Gespaltene genomische DNS (~20 µg) wurde über Agarose- Gelelektrophorese (vgl. 3.7.1; mittlerer Größe, 100 ml, 0,5% TAE, 1% Agarose) aufgetrennt (33V, 20-22 h) und durch Anlegen eines Fluoreszenzlineals als Größenmaßstab unter dem UV- Transilluminator (Pharmacia Biotech Image Master[®] VDS) dokumentiert. Beim sogenannten Southern- Blot wird DNS aus einem Agarosegel durch Kapillarsog auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) übertragen [130]. Zur Depurinierung der DNS wurde das Gel 10 min in 0,25 M HCl auf einer Wippe (10 UpM, GFL 3013) bei RT inkubiert. Das Gel wurde mit A. bidest gespült, 30 min bei RT auf der Wippe (10 UpM, GFL

3013) denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Beim Aufbau des Blots wurde eine Glasplatte quer auf eine mit 1 l Transferpuffer (0,25 M NaOH, 1,5 M NaCl) gefüllte Melaminschale gelegt. Auf dieser Glasplatte liegen zwei mit Transferpuffer angefeuchtete 3MM- Papiere, das mit den Taschenöffnungen nach unten liegende Gel, welches bündig mit Parafilmstreifen umlegt wurde. Hierdurch wirken später die Kapillarkräfte nur im Bereich des Gels. Auf das Gel wurde eine von A. bidest angefeuchtete und in Transferpuffer äquilibrierte Nylonmembran gelegt, so dass das Gel vollständig bedeckt wurde. Auf die Membran wurden zwei in Puffer getränkte 3MM- Papiere in Gelgröße gelegt. Luftblasen mussten beim Blot- Aufbau vermieden bzw. entfernt werden. Der Blot- Aufbau wurde mit zwei 15 cm hohen Stapeln Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen sowie mit einer Glasplatte und einem Gewicht (etwa 500g) stabilisiert und beschwert. Der Transfer fand ün oder übers Wochenende statt. Mit Bleistift wurde beim Abbau die Position der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert. Die Nylonmembran wurde nach dem Abbau in 2x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und Salzkristallbildung zu vermeiden. Nachdem die Membran 1 h bei RT getrocknet wurde, wurde die DNS UV- vernetzt (UV Stratalinker[®] 2400, Stratagene). Die Vollständigkeit des DNS- Transfers wurde durch Betrachten des Gels auf dem UV- Transilluminator (Pharmacia Biotech Image Master[®] VDS) und der Membran unter der UV- Handlampe (Bachofer HL 6M, 302 nm) überprüft.

3.13 Chemilumineszenter Nachweis von Nukleinsäuren und Hybridisierung mit einer markierten Sonde

Komplementäre Sequenzen können auf Nylonmembranen durch Hybridisierung mit einzelsträngigen Biotin- markierten DNS- Molekülen nachgewiesen werden. Die Stabilität der durch Basenpaarung entstehenden Hybridmoleküle ist vom Komplementaritätsgrad der beiden Moleküle abhängig. Da die Stringenz, d.h. die Selektivität der Hybridisierung, durch die Temperatur beeinflusst wird, kommen unspezifische Paarungen kaum vor, wenn die Temperatur nahe am Schmelzpunkt ideal gepaarter Hybridmoleküle liegt. Die Temperatur kann ohne Verlust der Stringenz durch Zugabe von Formamid, welches Wasserstoffbrücken- Bindungen destabilisiert, auf 42 °C gesenkt werden. Hierdurch werden die Arbeitsschritte erleichtert und die DNS- Moleküle weniger beschädigt als bei Temperaturen um 65 °C.

3.13.1 Herstellung Biotin- markierter Sonden

Für die Herstellung der Sonden wurden die gewünschten DNS- Fragmente mittels PCR (vgl. 3.2) amplifiziert. Die DNS- Fragmente (5 ng – 1 µg) wurden nach dem Herstellerprotokoll mit Biotin markiert (NEBlot Phototope Kit, New England BioLab). Die markierten Sonden werden in 20 µl TE- Puffer aufgenommen und bei –20 °C eingelagert.

3.13.2 Vorhybridisierung

Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran mit gebundenen Nukleinsäuren mit der DNS/RNS- Seite nach innen aufgerollt und in eine Hybridisierungsröhre überführt. In die auf 42 °C erwärmte Hybridisierungslösung wurden 50 µl gescherte Heringssperma- DNS (5 min denaturiert, 5 min auf Eis, 10 mg/ml, Invitrogen) gegeben, die Hybridisierungslösung gut durchmischt und die Membran für 3 h bei 42 °C im Rollinkubator (GFO 7601) vorhybridisiert. Dieser Schritt diente der Blockierung aller unspezifischen Bindungsstellen durch die Heringssperma- DNS.

3.13.3 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde in die Hybridisierungslösung 5 min hitzedenaturierte, biotinylierte Sonde gegeben, die Hybridisierungslösung gut durchmischt und die Membran nun bei 68 °C im Rollinkubator (GFO 7601) hybridisiert. Die Menge der eingesetzten Sonde wurde nach Herstellerangaben (Amersham, Freiburg) errechnet und eingesetzt. Während der Hybridisierung band die Sonde spezifisch unter Verdrängung der unspezifisch gebundenen Heringssperma- DNS an die Zielsequenzen.

3.13.4 Waschen

Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene Sonde durch Waschen der Membran entfernt. Das Waschen erfolgte im Schüttelwasserbad (60 UpM) bei RT mit unterschiedlichen Waschlösungen in folgender Reihenfolge:

2x 5 min 2,0x SSC/ 0,1% SDS

2x 5 min 0,1x SSC/ 0,1% SDS bei 68 °C

Danach konnte die Detektionsreaktion erfolgen.

3.13.5 Chemilumineszente Detektion

Die Detektionsreaktion wurde genau nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde das Phototope Star Detection Kit (New England Biolabs) verwendet. Der letzte Schritt erfolgte lichtgeschützt und die Membran wird luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in eine BioMax Kassette (Kodak) eingelegt. Die Exposition erfolgt sehr schnell und die Entwicklung der Filme (x-ray, Amersham) erfolgt 30 sec bis 10 min nach Auflage der Filme. Zur leichteren Orientierung nach der Entwicklung des Films wurde nach dem Einschweißen Markierungen auf der Folie gemacht, welche auf den Film übertragen wurden. Über die Markierung der Taschen ließen sich die Größen der Fragmente bestimmen. Die Entwicklung des Films wurde in einer Entwicklermaschine durchgeführt (Agfa Curix 60).

3.14 Chromatin Immun- Präzipitations- Test (ChIP)

Bei einem ChIP- Test werden die Zellen permeabilisiert und die Proteine an die DNS fixiert. In dieser Arbeit wurde der gesamte ChIP- Test mittels des Chromatin immunoprecipitation (ChIP) Assay Kits (upstate, Schwalbach) durchgeführt. Hierfür wurden zuerst die Zellen durch Formaldehyd fixiert und anschließend mit Proteinase- Inhibitoren gewaschen und durch SDS-Lysis- Puffer lysiert. Nach diesem Schritt wurde die DNS mit den fixierten Proteinen sonifiziert, so dass etwa 1 kb große DNS-Fragmente entstehen. Anschließend wurden die an DNS Fragmente fixierten Proteine nach Herstellerangaben weiter behandelt. Das Prinzip beruht auf den spezifischen Bindungen von Antikörpern gegen die von der DNS gebundenen Proteinen bzw. deren Proteinmodifikationen. In dieser Arbeit wurden die Antikörper gegen acetyliertes H3 und H4, sowie trimetyliertes Lysin 4 des Histon 4 verwendet. Mit Protein Agarose Beads (upstate) gegen den primären Antikörper werden die Antikörper- Protein- DNS Komplexe präzipitiert. Bei diesem Schritt wird zur Verhinderung unspezifischer Bindungen an die Agarose denaturiertes Heringssperma zugegeben. Um die Agarose wieder von den DNS- Protein Komplexen zu trennen, wurde die gesamte Suspension mit Puffern mit steigender Salzkonzentration (Menge und Konzentration nach Herstellerangaben) gewaschen. Hierbei war wichtig, dass die Waschschrte bei RT stattfinden, aber die Zentrifugationsschritte zwischen den einzelnen Puffern bei 4 °C durchgeführt wurden. Die DNS wurde über mehrere Elutionsschritte mit einer gepufferten Lösung und einem abschließenden Schritt durch die Zugabe von 5 M NaCl bei 65 °C von den fixierten Proteinen befreit. Für die Quantifizierung der präzipitierten DNS- Fragmente wurde

die Methode der RTQ-PCR mit Primern für die Region von Interesse durchgeführt. Hierfür musste die DNS in einem sehr sauberen Zustand vorliegen. Um dieses zu erreichen, wurde die DNS mit dem NucleoSpin ExtractionII Kit (Macherey- Nagel, Düren) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte strikt nach Herstellerangaben.

3.15 Methoden der Zellkultur von isolierten Mauszellen und Zelllinien der Maus

Ex vivo isolierte murine Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden in Heraeus- Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Sie lassen sich bei einem CO₂- Gehalt von 5 % in Zellkulturplastikgefäßen kultivieren. Beim Arbeiten mit den Zellen wurden mit der Ausnahme der verwendeten Glas- Pasteur- Pipetten sterile Einmal- Plastik- Materialien verwendet (Castor). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 1200 UpM für 8 min in einer Heraeus Megafuge 1.0R bei 4 °C oder RT durchgeführt. Murine Zellen, die Zelllinien 293Heck und RLM-11 wurden in RPMI und alle anderen Zelllinien in DMEM Vollmedium kultiviert (vgl. 2.8).

3.15.1 Auftauen von Zellen

Die in Einfrierröhrchen (NUNC) in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden schnell in einem 37 °C- Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 ml Kulturmedium gefüllt, durchmischt und zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellsediment in einem gewünschten Volumen Medium resuspendiert und auf ein Kulturgefäß gewählter Größe ausgesät.

3.15.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen sedimentiert und in Einfriermedium mit 20 % (v/v) DMSO resuspendiert und auf Einfrierröhrchen verteilt. Die Menge des Einfriermedium wird durch die Zellzahl bestimmt, ein ml Medium für 1×10^7 bis 1×10^8 Zellen. Die Röhrchen wurden für mindesten 4 h bei -70 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.15.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau vermischt. Tote Zellen nehmen diesen Farbstoff an und wurden somit blau gefärbt. Die Zellsuspension wurde auf eine Neubauerzählkammer gegeben und alle lebenden Zellen wurden in den vier Quadranten ausgezählt. Die Gesamt- Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n/4 * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kulturvolumen} * 10^4$$

3.15.4 Passagieren von adhärenenten Zellen

Nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums wurde der Zellrasen zur Entfernung aller Mediumreste und toter Zellen zweimal mit PBS (37 °C) gewaschen. Durch Zugabe von 1/15 Kulturvolumen Trypsin bei den kleinen Schalengrößen und 1/7 Kulturvolumen Trypsin ab der 6-Loch- Schale wurden die adhärenent wachsenden Zellen in einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C vom Kulturgefäßboden abgelöst und durch Klopfen und/oder Schwenken des Kulturgefäßes vereinzelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium (vierfaches Volumen des eingesetzten Trypsin) abgestoppt und die Zellen anschließend sedimentiert. Das Sediment wurde in einem geeigneten Volumen frischen Mediums resuspendiert und entweder in gewünschter Dichte ausgesät, eingefroren (vgl. 3.15.2) oder zur Transfektion verwendet (vgl. 3.18).

3.15.5 Ex vivo Isolierung von murinen Lymphozyten

Für die Isolierung von murinen Lymphozyten wurden 6-8 Wochen alten Mäusen die peripheren und mesenterialen Lymphknoten und die Milz entnommen. Die Organe wurden zerkleinert und durch ein feinmaschiges Sieb (Rotilabo- Rundsiebe, Roth) zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension gedrückt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (zur Vermeidung von großen Fettanhäufungen bei RT) und durch ein weiteres Sieb gegeben (Cell Strainer, 70 µm, BD). Die Zellen konnten nun für die weitere Isolation mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mit magnetischen Beads markiert werden (vgl. 3.15.6). Nach diesem Schritt mussten die gefärbten und mit Beads markierten Zellen für die Sortierung am Automacs gefiltert werden (Preseparationfilter, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Bei diesem Schritt war es wichtig, PBS und nicht Medium zu verwenden, da die Sortierung am Automacs durch die einzelnen Mediumkomponenten gestört wird. Je nach gewünschten Phänotyp der zu isolierenden

Zellen mussten die Färbeschritte und Sortierungen wiederholt werden. Der Automacs (Miltenyi Biotch) wurde nach Herstellerangaben verwendet.

3.15.6 Färbung von Zellen

Die Färbung von Zellen beruht auf der Bindung von Antikörpern an ihr Antigen. Bei allen Färbungen wurde Antigen- spezifische mit Fluoreszenz- Molekülen markierte Antikörper (vgl. 2.9) eingesetzt. Die Färbung mit Antikörpern erfolgte in PBS/BSA für 15 min auf Eis im Dunkeln. Die Antikörper wurden entsprechend der austitrierten Vorgaben in einem 100 µl Färbeansatz eingesetzt. Bei allen Färbungen wurde zur Blockade von unspezifischen Bindungen 20 µg/ml anti Fcγ Rezeptor zum Färbeansatz hinzugefügt. Die Markierung mit Beads (Miltenyi) wurde ebenfalls für 15 min, aber bei 4 °C durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen.

3.15.6.1 Foxp3- Färbung

Die Foxp3- Färbung der Zellen erfolgte nach dem Protokoll der Firma eBioscience. Es wurde die eingesetzte Menge Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer, sowie der Permeabilisierungspuffer um die Hälfte reduziert. Der Foxp3- Antikörper wurde wie vorgeschlagen 1µg auf 1×10^6 Zellen eingesetzt.

3.15.7 Kulturbedingungen

Die $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+CD25^-$ T- Zellen wurden mit an den Boden des Kulturgefäßes gebundenen 6 µg αCD3 und 4 µg αCD28 für 48 h stimuliert. Nach sechs Tagen erfolgte eine weitere Stimulation der T- Zellen mit 2 µg αCD3 und 1 µg αCD28 für 48 h. Über den gesamten Verlauf der Kultur wurde den T- Zellen 10 ng/ml IL-2 (rmIL-2, R&D, Minneapolis) und bei den $CD4^+CD25^-$ T- Zellen 5 ng/ml TGF-β (porcine TGF-β1, R&D, Minneapolis) zugegeben. Die Kulturen der $CD4^+CD25^+$ und der Kontrollpopulation der $CD4^+CD25^-$ T- Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen ohne TGF-β.

3.16 Durchflusszytometrische Analyse

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie erlaubt die Untersuchung der Expression verschiedener Oberflächenproteine und intrazellulärer Proteine auf Einzelzellebene. Alle in dieser Arbeit

dargestellten Messungen wurden am FACS Calibur (BD Bioscience) vorgenommen. Die markierten Zellen passieren nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Diodenlaser. Hierdurch werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, gleichzeitig streuen die Zellen das Licht. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreulicht (FSC), welches in einem geringen Winkel von 3-10° gestreut wird und dem Seitwärtsstreulicht (SSC), welchem dem um 90° reflektierte Licht entspricht. FSC korreliert mit der Zellgröße und SSC mit der Granularität und Membranfaltung der Zelle. Diese beiden Signale werden im Gegensatz zum Fluoreszenzlicht (logarithmisch) in einer linearen Verstärkung aufgenommen. Zur Messung des Fluoreszenzlichtes unterschiedlicher Wellenlängen gibt es unterschiedliche Systeme aus Bandpassfiltern und Photoröhren. Über die Anregung mit dem Argonlaser wurden die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3) und über den Diodenlaser die Fluoreszenz der Wellenlänge 661 nm (FL4) gemessen. Tote Zellen und Bruchstücke wurden durch ihre Lage im FSC bzw. SSC ausgeschlossen, bei der Messung von unfixierten Zellen zusätzlich über die Anfärbung mit Propidiumiodid (PI). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „CellQuest- Pro“ (BD Bioscience). Durch Setzen von elektronischen Analysefenstern wurden die gewünschten Zellpopulationen analysiert.

3.17 *In vitro* Proliferations- Test

Dieser Test wurde in 96- Well- Platten mit rundem Boden in einem Kulturvolumen von 200 µl RPMI-Medium für 72 h durchgeführt. Es wurden 1×10^5 *ex vivo* isolierten T- Zellen (vgl. 3.15.5) kultiviert. Die T- Zellen wurden durch die Zugabe von 1 µg/ml löslichem CD3 und 2×10^5 Antigen präsentierenden Zellen (APZ) stimuliert. Die APZ sind CD90 depletierte Zellen. Die T- Zellen setzen sich aus CFSE- markierten naiven T- Zellen ($CD4^+CD62L^{high}$) und den möglichen Tregs zusammen. Für die CFSE- Färbung müssen die naiven T- Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt werden. Das CFSE wurde entsprechend einer Endkonzentration von 2,5 µM eingestellt und die Zellen in der Färbelösung resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 2 min und 40 sec bei RT, danach wurden die Zellen in kaltem RPMI- Medium zweimal gewaschen. An Hand der CFSE-Markierung konnte man die Proliferationsrate der naiven Zellen bestimmen. Bei jeder Teilung wird der Farbstoff CFSE gleichmäßig auf beide entstandenen Zellen verteilt, so dass ein schwache CFSE-Markierung der Zellen für eine hohe Proliferationsrate steht. In dem *in vitro* Proliferations- Test bedeutet wenig CFSE und viele Teilungspopulationen, dass die naiven Zellen proliferiert sind und nicht durch die anwesenden Tregs supprimiert wurden. Wenige Teilungspopulationen und geringe CFSE-

Verdünnung bedeutet, dass die naiven T- Zellen von den Tregs supprimiert wurden und nicht proliferiert sind.

Die Zellzahl der einzelnen Populationen wurde durch das Verhältnis der naiven Zellen zu den Tregs bestimmt und überschreitet die vorgegebene Menge von 1×10^5 Zellen nicht. Die drei Zellpopulationen, APZ, naive und regulatorischen Zellen wurden zusammenpipetiert und nach 72 Stunden wird die Verdünnung der CFSE- Markierung der naiven T- Zellen per Durchflusszytometrie (vgl. 3.16) analysiert. Als Kontrollen diente die Proliferation von naiven Zellen in Abwesenheit von Tregs (positiv Kontrolle) und unstimuliert naive T- Zellen (negativ Kontrolle).

3.18 Amaxa Transfektionen

Für die Transfektion bzw. Nucleofektion wurde der Nucleofector der Firma Amaxa genutzt. Ebenfalls wurden die benötigten Komponenten, Medium, Nucleofectorsolution etc. von Amaxa verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Pro Transfektion bzw. Küvette wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zu diesen Zellen wurden 95 μ l Nucleofectorsolution zugegeben. Hierbei ist zu bedenken, dass diese Lösung toxisch für die Zellen ist und nach spätestens 15 min mit Medium verdünnt werden muss. Es wurden von den Luciferase- Plasmiden 1-4 μ g DNS und von dem pTKRenilla Kontrollplasmid 200 ng DNS transfiziert. Die Zellen in der Nucleofectorsolution wurden in Küvetten überführt und mit dem Programm W-01 für naive und A-23 für die Zelllinien nucleofektiert. Nach der erfolgreichen Nucleofektion wurde die Zellen in 1,5 ml IMDM Medium überführt und auf 12-Well Platten gegeben. In diesen 1,5 ml Medium mussten die Zellen für 3 bis 4 h ruhen und wurden dann gewaschen und in zwei ml frischem IMDM- Medium weiterkultiviert und je nach Ansatz stimuliert. Die Zelllinien wurden nach der Transfektion mit 10ng/ml PMA für 24 Stunden und die naiven T- Zellen wurden mit an den Boden des Kulturgefäßes gebundenen 6 μ g α CD3 und 4 μ g α CD28 für 48 h stimuliert.

3.19 Adaptiver Transfer von $CD4^+CD25^+$ T- Zellen

Für die Analyse des Verhaltens von Zellpopulationen *in vivo* wurde die Methode des adaptiven Transfers genutzt. Hierfür werden 2×10^6 $CD4^+CD25^+$ T- Zellen mit CFSE markiert (vgl. 3.17) und anschließend in syngene Mäuse i.v. gespritzt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen der Milz, dem peripheren und mesenterialen Lymphknoten entnommen und auf CD4, CD25 und Foxp3 (3.15.6) gefärbt und mit der durchflusszytometrische Analyse untersucht (vgl. 3.16).

3.20 Diphtheria Toxin Gabe zur Depletion von Tregs in den DEREK- Mäusen

Die Toxine von Merck und Sigma wurden nach Herstellerangabe gelöst und als Aliquots bei -80 °C eingefroren. Jedes Aliquot wurde nur dreimal aufgetaut, da das Toxin bei RT instabil wird. Um ein frühzeitiges Auftauen zu verhindern, wurden die Aliquots auf Trockeneis transportiert. Bei den ersten Depletionsversuchen wurden den WT- und DEREK- Tieren jeden Tag 1 µg DT s.c. (subkutan) verabreicht. Bei dem Vergleich der beiden Toxine von Merck und von Sigma wurde den Tieren 1 µg Toxin nur jeden zweiten Tag s.c. gespritzt. Zur Überprüfung der Depletion wurden die Zellen nach zweimaliger DT- Gabe am Tag 3 *ex vivo* isoliert (vgl. 3.15.5) und auf CD4, CD25 (vgl. 3.15.6) und Foxp3 (vgl. 3.15.6.1) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histologie erfolgte im Labor von Christoph Loddenkemper am Charité Campus Benjamin Franklin in Berlin Steglitz.

3.21 Dualer Luciferase- Test

Die mittels Nucleofektion transfizierten und anschließende stimulierten Zellen (vgl. 3.18) wurden in 2 ml Eppendorf tubes überführt und abzentrifugiert (2500 UpM, 4 °C, Eppendorf Centrifuge 547R, Eppendorf, Wesseling). Den einzelnen Proben wurden durch die Zugabe von 100 µl 1x Lysispuffer (PLB, Promega, Mannheim) und Inkubation für 15 min bei RT im Thermomixer comfort (Eppendorf) lysiert. Die Lysate bzw. Membranbestandteile und weitere Proteinreste wurden bei 13.000 UpM (4 °C, Eppendorf Centrifuge 547R, Eppendorf) sedimentiert. Für den Test wurden 40 µl des Überstandes eingesetzt. Die Zugabe der beiden Substrate, zum einem das Firefly Substrat (Promega) und zum anderen das Renilla Substrat (Promega) zu den einzelnen Proben erfolgte durch eine automatische Einspritzanlage. Die Aktivität der Renilla- Luciferase dient der Normalisierung der einzelnen Proben auf deren Aktivität die Firefly- Aktivität bezogen wird (vgl. Formel). Das Renilla Substrat beinhaltet zusätzlich noch eine inaktivierende Substanz, welche die Aktivität der Firefly- Luciferase stoppt. Die Lumineszenz der beiden Luciferasen wurde durch ein Luminometer (BD, Heidelberg) gemessen. Nach der erfolgreichen Messung erfolgte die Berechnung der relativen Licht units (RLU) nach folgender Formel:

$$(\text{Renilla Aktivität})/(\text{höchste Renilla Aktivität im Experiment}) * (\text{Firefly Aktivität})$$

Mittelwert der Triplikate ergibt RLU

4 Ergebnisse

4.1 Erzeugung einer transgenen Foxp3- Reportermaus

Ziel des Projektes war die Erzeugung einer transgenen Reportermaus, die zusätzlich zur endogenen Foxp3- Expression noch ein Reportergen unter der Kontrolle des Foxp3- Promoters exprimiert. Die Reportermaus bietet den Vorteil, dass Foxp3⁺ T- Zellen über das Reportermolekül lebend sortiert werden können. Hier für sollte ein BAC in embryonale Stammzellen eingeschleust werden, der große Bereiche des *foxp3*- Lokus enthält, aber durch die Rekombination mit dem Reportergen die Expression des *Foxp3*- Gens im ersten Exon abgebrochen wird. Die BAC- Technologie bietet einem die Möglichkeit, in relativ kurzer Zeit die gewünschte Maus fertig zu stellen. Bei dieser Methode muss man im Gegensatz zur klassischen „Knock Out“ oder „Knock In“ Technologie nicht auf embryonale Stammzellklone selektieren, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, sondern nur auf rekombinierte Klone. Dieser Schritt wird dadurch deutlich schneller und einfacher in der Überprüfung der Klone. Ein weiterer entscheidender Grund für die Herstellung einer transgenen BAC- Reportermaus war, dass Foxp3 auf dem X-Chromosom liegt und ein „Knock Out“ bzw. „Knock In“, welcher das endogene Foxp3 zerstört, bei allen männlichen und homozygoten Tieren zu embryonaler Letalität führt (vgl. „scurfy“- Maus, (28); (29); (30)). Mittels des transgenen BACs erhält man die Möglichkeit, Foxp3⁺ Zellen über das Reporterprotein eYFP (enhanced Yellow Fluorescence Protein) zu identifizieren und zu analysieren und verliert nicht die Expression des endogenen Foxp3- Gens. Die Tregs behalten ihre suppressiven Eigenschaften und es kommt nicht zum von Brunkow und Ramsdell beschriebenen „scurfy“ Phänotyp [131].

4.1.1 Strategie zur Erzeugung einer BAC- transgenen Maus mit einem Reportergen im *foxp3*- Lokus

Durch die Erzeugung einer BAC- transgenen Maus erhält man die Möglichkeit, wie in der Einleitung erläutert, eine Veränderung in den Mäusen bzw. Zellen vorzunehmen, ohne den endogenen Lokus zu verändern. Im Falle der hier vorgenommenen Veränderung am *foxp3*- Lokus wurde in dem BAC im ersten Exon des *Foxp3*- Gens mittels homologer Rekombination das Gen für das Reporterprotein eYFP, ein Polyadenylierungssignal (Poly A) sowie eine duale Resistenzkassette eingeführt. Es wurden für die Rekombination drei BAC- Klone des RZPDs (RPCIB731D08143Q2; RPCIB731H05147Q2; RPCIB731H08362Q2) verwendet. Diese drei Klone wurden gewählt, da auf ihnen der *foxp3*- Lokus in der Mitte des gesamten BACs liegt und man sich daher relativ sicher sein kann, dass möglichst viele der up- und downstream liegenden regulativen Elemente im BAC enthalten sind. Für die

Rekombination wurde der in Abbildung 4-1 dargestellte Zielgenvektor kloniert. Der Vektor besteht aus folgenden Elementen:

1. Die kodierende Region des eYFPs zusammen mit einem PolyA des Virus Simian vacuolating 40 (SV 40) wurde dem Vektor IRES-eYFPpA-IL-2neo (zur Verfügung gestellt von Markus Mohrs, Saranac Lake, USA) entnommen und in ein pBSK (pBluescript) Plasmid über vorhandene Schnittstellen eingefügt.
2. Für die Selektion in den Bakterien und in den embryonalen Stammzellen (ES- Zellen) wurde eine duale Kassetten mit einer Kanamycin- und einer Neomycinresistenz ebenfalls in das Plasmid pBSK kloniert. Die Kassetten ist von zwei *frt*- Erkennungssequenzen flankiert, die es einem ermöglichen, nach erfolgreicher Selektion von ES- Zellen die Selektionskassetten mit Hilfe der *flp*- Rekombinase zu entfernen. Dieses ist entweder mit Hilfe eines *Flp*- Expressionsplasmids direkt in den ES- Zellen oder später durch Kreuzung der BAC- transgenen Maus mit einer Rekombinase exprimierenden transgenen Maus möglich.
3. Für eine erfolgreiche homologe Rekombination des Zielvektors mit der BAC- DNS wurden mittels PCR die 5' und 3' homologe Region des *Foxp3*- Gens gewonnen. In dieser Arbeit wurden Regionen mit einer Größe von 300bp für die 5' und von 265bp für die 3' Region erstellt, da bei der hier verwendeten Methode des ET- Klonierens die homologen Regionen im Vergleich zu den Regionen bei der Technologie des „Knock In“ bzw. „Out“ nicht größer sein müssen.

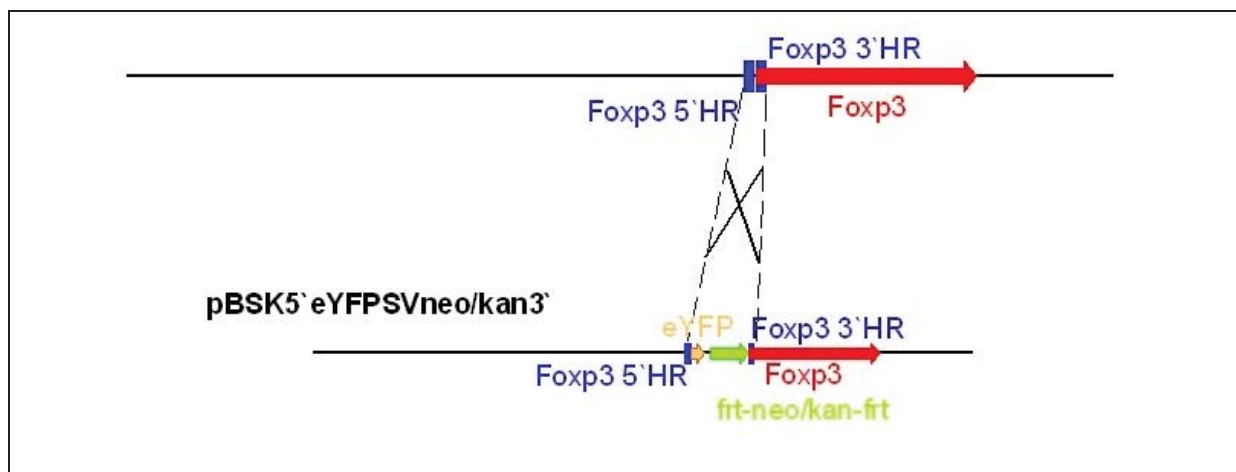


Abbildung 6: Schema für die homologe Rekombination des Repotergens eYFP mit der kodierenden Region des *Foxp3*- Gens

Abkürzungen: HR= homologe Region; *frt*= *frt*- Erkennungssequenz; neo= Neomycin; kan= Kanamycin; eYFP= enhanced Yellow Fluorescence Protein

4.1.2 Klonierung des Zielgenvektors pBSK5'eYFPSVneo/kan3'

4.1.2.1 Einführung der kodierenden Region des eYFPs und des SV40PolyA

Die kodierende Region von eYFP und das PolyA des Virus SV40 wurden durch Restriktion mit den Endonukleasen *KpnI* und *XhoI* aus dem Vektor IRES-eYFPpA-IL2neo geschnitten. Der Vektor pBSK wurden ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *XhoI* geöffnet. Das Fragment bestehend aus eYFP und SV40PolyA konnte somit zielgerichtet in den Vektor pBSK kloniert werden (vgl. Abb. 4-2). Es musste somit anschließend nicht die Orientierung des Fragmentes im Vektor überprüft werden. Die Ligation wurde mit Hilfe der *KpnI*, *NcoI* und *XhoI* Restriktionen überprüft.

Wie in Abbildung 4-2 zu erkennen wurde durch diese Restriktion mit den Endonukleasen *KpnI* und *XhoI* ein Teil der IRES (Internal Ribosom Entry Site) mit in den Zielgenvektor kloniert. Dieser Teil wird im nächsten Schritt durch die Einführung der 5' Homologie jedoch wieder entfernt (vgl. 4.1.2.2).

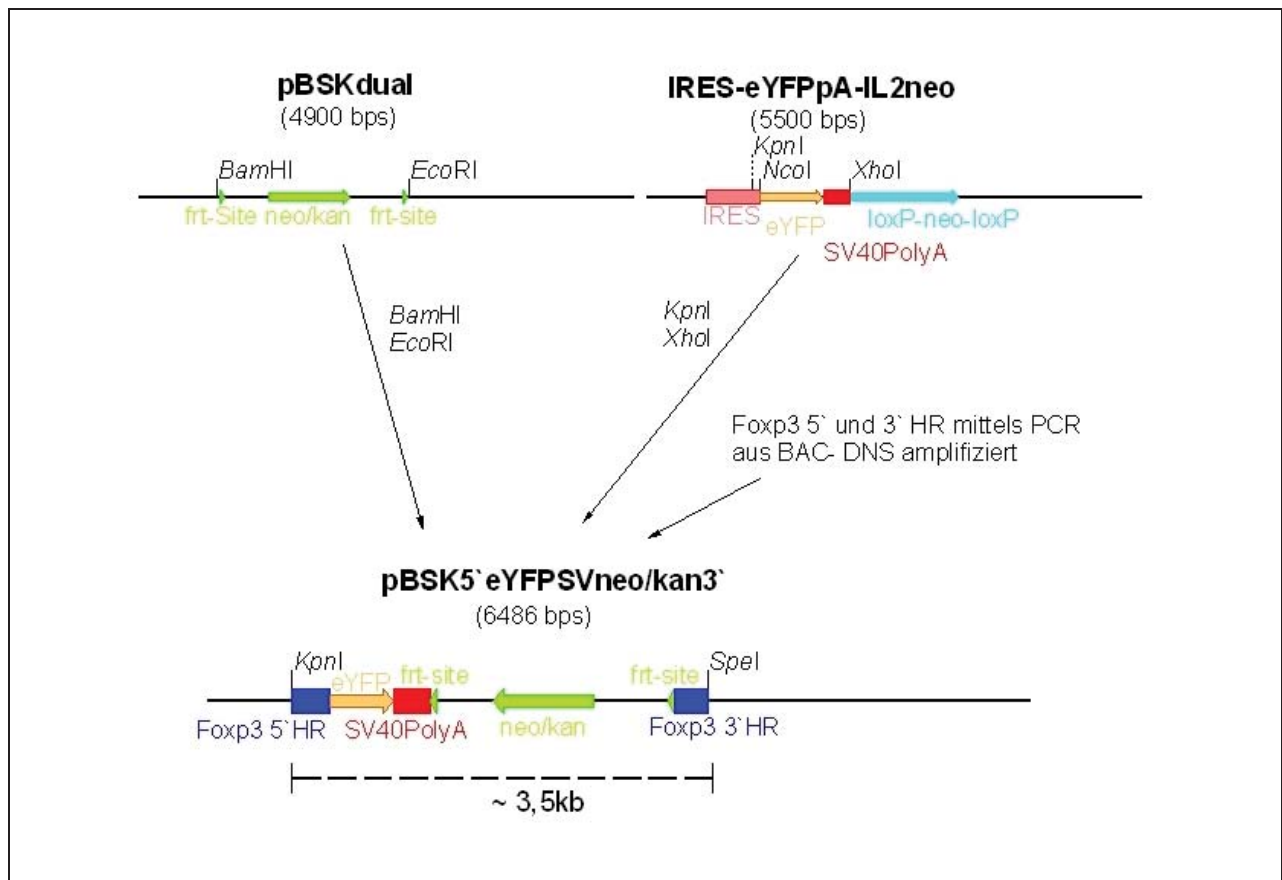


Abbildung 7: Klonierung des Zielgenvektors pBSK5' eYFP SVneo/kan3'

Die Selektionskassette *frt-neo/kan-frt* wurde mit den Endonukleasen *BamHI* und *EcoRI*, die kodierende Region des *eYFP* Gens zusammen mit dem *SV40PolyA* mit den Endonukleasen *KpnI* und *XhoI* geschnitten und in den Vektor pBSK eingebracht. Die homologen Regionen (HR) des *foxp3*-Lokus wurden mittels PCR amplifiziert und dann mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und ebenfalls in den Zielgenvektor pBSK kloniert.

4.1.2.2 Erzeugung der homologen Regionen

Die Erzeugung der homologen Regionen erfolgte mittels eines PCR- Mutagenese Ansatzes, bei dem die notwendigen Schnittstellen zur Klonierung in den Zielgenvektor in die homologen Bereiche eingeführt wurden. Mit Hilfe der Primer 5'Fragmenthin bzw. -rück und 3'Fragmenthin bzw. -rück (vgl. Tabelle 2-4) wurden die beiden Regionen mit dem BAC als Template für den PCR- Ansatz amplifiziert. Die entstandenen PCR- Produkte wurden mit den Endonukleasen *KpnI* und *NcoI* für die 5' und *BamHI* und *EcoRI* für die 3' homologen Bereiche geschnitten. Der Zielgenvektor wurde ebenfalls zuerst mit den Endonukleasen *KpnI* und *NcoI* geschnitten und der 5'homologe Bereich eingebaut. Durch diesen Schnitt wurden auch die Teile der IRES entfernt, die durch den in Abschnitt

4.1.2.1 beschriebenen Schritt noch vorhanden waren. Die erfolgreiche Ligation wurde mittels Restriktion mit den Endonukleasen *KpnI*, *NcoI* und *XhoI* überprüft.

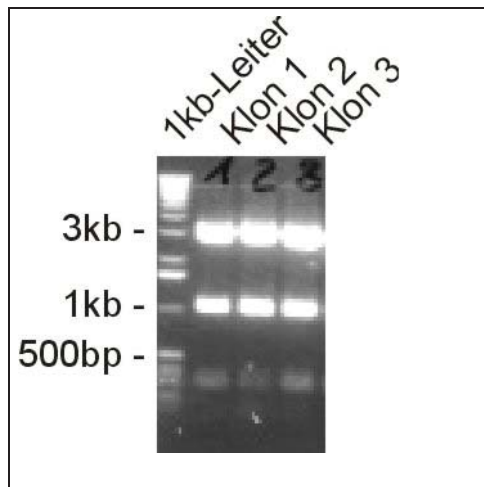


Abbildung 8: **Restriktionsanalyse des Plasmides pBSKeYFP5**

Spur 1: 10µl 1kb DNS- Standard (50ng/µl); Spur 2-4: Restriktion mit *KpnI*, *NcoI* und *XhoI*; jeweils 10µl des Restriktionsansatzes eingesetzt; drei Banden erkennbar, die Unterste ist durch die lange Laufzeit des Gels nicht sehr deutlich erkennbar.

Die in Abbildung 4-3 dargestellten Restriktionen zeigten die erwarteten Banden von 3kb, 1kb und 300bp. Die drei isolierten Klone beinhalteten alle das richtige Plasmid mit der kodierenden Region des eYFPs und der 5' homologen Region. Mit diesen Klonen konnten die nächsten Schritte der Erzeugung des Zielgenvektors unternommen werden. Neben der Restriktionsanalyse wurden die Klone zusätzlich sequenziert und zeigten hierbei auch die korrekte Sequenz (vgl. 8.1.1).

Die Klonierung der 3' homologen Region erfolgte durch Restriktion des Vektors mit *BamHI* und *SpeI*. Dieser Schritt wurde allerdings erst nach Klonierung der Neo/Kan- Kassetten (vgl. 4.1.2.3) durchgeführt, da die 3' homologe Region eine Schnittstelle (*EcoRI*) enthält, die für diese weitere Klonierung notwendig ist. Die Ligation des 3' homologen Bereiches wurde ebenfalls mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung (vgl. 8.1.1) überprüft.

4.1.2.3 Einführung der Selektionskassette

Die Einführung der Selektionskassette mit *frt*- Erkennungssequenzen und den kodierenden Regionen für die Resistenzgene Kanamycin und Neomycin wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt, wie die schon in 4.1.2.1 beschriebene Einführung der kodierenden Region des eYFPs. Für diesen Schritt wurden die Endonukleasen *BamHI* und *EcoRI* verwendet und der Zielgenvektor mit den gleichen Nukleasen geöffnet. Die Selektionskassette wurde durch diese gerichtete Klonierung in umgekehrter Leserichtung eingebaut (vgl. Abb. 4-2). Die umgekehrte Leserichtung verhindert, dass es in den embryonalen Stammzellen und auch bei der Züchtung der Maus nicht zu Fusionsprodukten bestehend aus eYFP und der noch nicht durch die Flip- Rekombinase entfernten Selektionskassette kommt.

4.1.3 Analyse des Zielgenvektors

Zur Überprüfung des Zielgenvektors wurden unterschiedliche Ansätze von Restriktionen durchgeführt. Sie dienten zur Überprüfung der Vollständigkeit des Vektors und der richtigen Orientierung der einzelnen Fragmente. Der wichtigste Ansatz war die Überprüfung der beiden Schnittstellen für die Endonukleasen *KpnI* und *SpeI*, da mit diesen Nukleasen das gesamte Insert aus dem Vektor heraus geschnitten werden kann. Dieser Schritt ist in Abbildung 4-4 in Spur 1 zu sehen, die Bande der Größe 3kb ist das pBSK Plasmid und die der Größe 3,5kb das Insert. Dieses ist für die anschließende Elektroporation mit den Bakterien notwendig, da nur das Insert und nicht der gesamte Vektor elektroporiert wurden. Auch die Überprüfung des Zielgenvektors mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* in Spur 2 und *PstI* in Spur 3 zeigte das erwartete Bandenmuster.

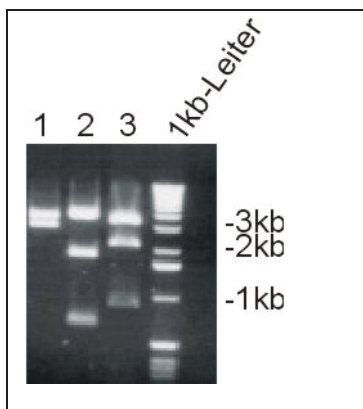


Abbildung 9: Restriktionsanalyse des Zielgenvektors

10µl 1kb DNS- Standard (50ng/µl); Spur 1: Restriktion mit *KpnI* und *SpeI* (3kb (pBSK) und 3,5kb (Insert)); Spur 2: Restriktion mit *NcoI* (4kb, 2kb, 800bp); Spur 3: Restriktion mit *PstI* (3,5kb; 2,3kb; 1kb); jeweils 10µl des Restriktionsansatzes eingesetzt

Zur weiteren Analyse wurde der Zielgenvektor sequenziert. Wie bereits in Punkt 4.1.2.1 und 4.1.2.2 erwähnt, wurden die einzelnen Fragmente nach Ligation in den Zielgenvektor sequenziert. In dieser abschließenden Sequenzierung wurden vor allem die Übergänge der einzelnen Fragmente zueinander und noch ein weiteres mal die Vollständigkeit der homologen Flanken überprüft.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass im Zielgenvektor pBSK5'sYFPSVneo/kan3' alle Fragmente mit der richtigen Basenfolge vorliegen. Die ermittelten Sequenzen liegen im Anhang (vgl. 8.1.1) vor.

4.1.4 Herstellung und Analyse der transgenen Klone

4.1.4.1 Elektroporation der Bakterien und homologe Rekombination des Inserts mit dem BAC

Die Methode des ET- Klonierens (vgl. 3.10) ermöglicht einem, das Insert bestehend aus der kodierenden Region des eYFPs und der dualen Selektionskassette zielgerichtet in den BAC einzubringen. Beim ET- Klonieren spielen die Rekombinasen E und T eine große Rolle. Sie vermitteln die homologe Rekombination des Inserts in den BAC. Durch diesen Schritt erhält das Insert im BAC die richtige Position. Die drei Foxp3- enthaltenen BACs (362, 147 und 143) wurden in dem Bakterienstamm DH10b vom RZPD geliefert. Da die beiden Rekombinasen E und T sich im Bakterienstamm EL250 befanden, musste als erstes der BAC aus dem Bakterienstamm DH10b isoliert und in den Stamm EL250 elektroporiert werden. Die Größe eines BACs lässt keine Transformation zu. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien bei 32°C auf Chloramphenicol und Ampicillin hochgezogen. Nur Bakterien mit dem BAC konnten unter diesem Selektionsdruck wachsen, es waren bei jedem elektroporierten BAC ca. 40-50 Klone gewachsen, so dass die nächsten Schritte problemlos folgen konnten. Die niedrige Temperatur wurde gewählt, da die beiden Rekombinasen in den EL250 Bakterien unter einem hitzeaktiven Hsp- Promoter integriert worden sind und bei einer Temperatur von 37°C aktiv werden. Ihre Aktivität ist aber erst nach erfolgreicher Elektroporation des Inserts gewünscht. Für die Elektroporation des Inserts wurden jeweils zehn Klone der drei unterschiedlichen BACs in die Bakterien EL250 ausgewählt. Die Elektroporation erfolgte nach einer Vermehrung der Bakterien mit den BACs auf eine OD von 0,6. Vor der Elektroporation werden die Bakterien für 15 Minuten bei 37°C gehalten, so dass die Rekombinasen aktiv sind, wenn sich das Insert in den Bakterien befindet. Nach dieser Elektroporation wurden die Bakterien wieder bei 32°C, um weitere unspezifische Rekombinationen zu verhindern, und unter dem Selektionsdruck durch Chloramphenicol und Kanamycin auf einer Agarplatte hochgezogen. Nach diesem Selektionsschritt waren bei dem BAC 147 keine Kolonien gewachsen und für den BAC 362 waren drei, sowie für den BAC 143 zwei Kolonien gewachsen. Da Bakterien am Besten bei 37°C wachsen und bei dieser Temperatur auch die Rekombinasen aktiv sind und es so zu unkontrollierten Rekombinationen kommen kann, musste der BAC aus den EL250- Bakterien isoliert, in DH10b zurück elektroporiert und dann unter dem gleichen Selektionsdruck und bei für Bakterien optimalen 37°C kultiviert werden (vgl. auch 3.10.2). Entstandene Kolonien sollten den BAC mit dem integrierten Insert enthalten. Alle gewonnenen Kolonien nach der Elektroporation des Inserts konnten auch nach diesem Schritt wieder gewonnen werden. Für die weitere Analyse standen, somit fünf Klone zur Verfügung. Die Klone mit dem BAC 362 bekamen die Bezeichnung S8-10 und die des BACs 143 8A und 8B. Die Überprüfung

der erfolgreichen Rekombination erfolgte mittels Southern- Blot- Analyse und Sequenzierung der gewonnenen Klone.

4.1.4.2 Southern- Blot- Analyse

Bei der Southern- Blot- Analyse wurde die homologe Rekombination sowie die einfache Integration untersucht. Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe von zwei externen Sonden und einer internen Sonde. Die beiden externen Sonden binden unmittelbar am 5`Ende (5`Sonde) bzw. am 3`Ende (3`Sonde) des Zielgenvektors pBSK5`eYFPSVneo/kan3`. Die interne Sonde bindet im Zielgenvektor im Bereich der dualen Selektionskassette.

Die rekombinierten BACs wurden zur Überprüfung der homologen Rekombination mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III für die 5` und mit *Bam*HI für die 3`Sonde geschnitten. Eine Darstellung der bei der Hybridisierung eingesetzten externen Sonden und der erwarteten Fragmentgrößen wird in Abbildung 4-5 gegeben.

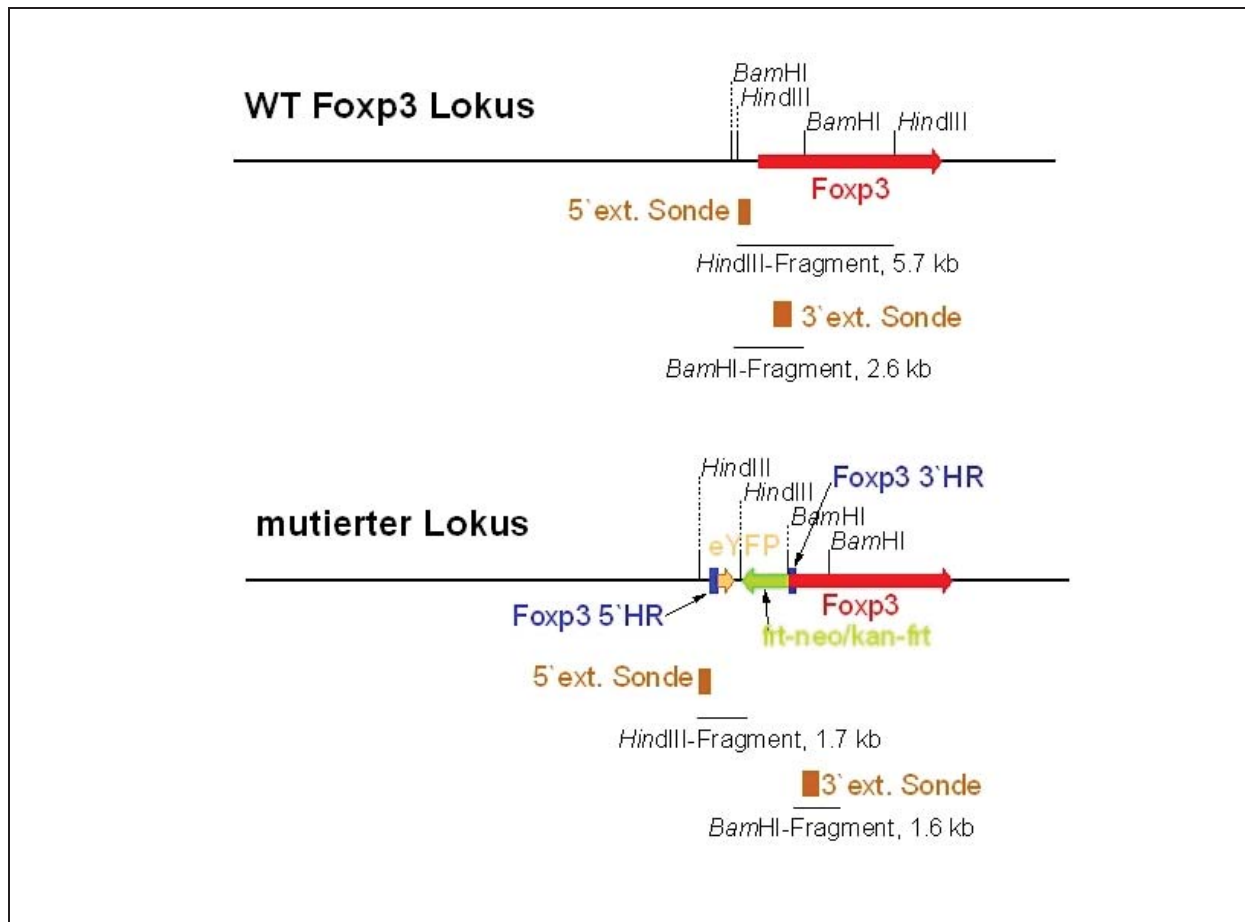


Abbildung 10: Darstellung des Southern- Blots mit den externen Sonden

Für die Hybridisierung des mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III verdauten WT BACs mit der 5'externen Sonde liegt das erwartete Signal bei 5,7kb und für den mutierten Locus bei 1,7kb. Bei der Hybridisierung mit der 3'externen Sonde liegt das erwartete WT Signal bei 2,6kb und für den mutierten Locus bei 1,6kb; ext. Sonde= externe Sonde, HR= homologe Region, frt= frt- Erkennungssequenz, neo= Neomycin.

Für die Überprüfung der einfachen Integration (interne Sonde) wurde die BAC- DNS ebenfalls mit *Hind*III geschnitten. Eine Darstellung der bei der Hybridisierung eingesetzten internen Sonde und der erwarteten Fragmentgrößen wird in Abbildung 4-6 gegeben.

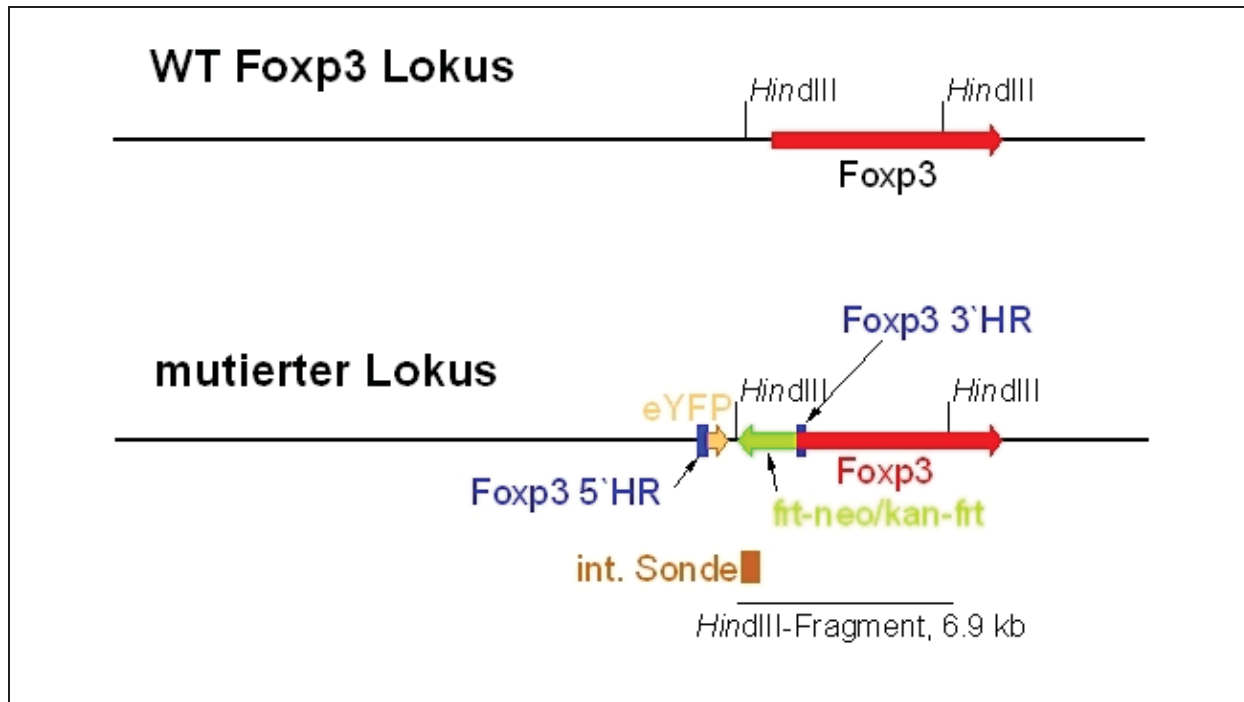


Abbildung 11: Darstellung der Southern- Blot- Analyse mit interner Sonde

Für die Hybridisierung mit der internen Sonde des mit *HindIII* verdauten WT BACs entsteht kein Signal, bei dem mutierten Locus liegt das erwartete Signal bei 6,9kb; int. Sonde= interne Sonde, HR= homologe Region, frt= frt- Erkennungssequenz, neo= Neomycin.

4.1.4.2.1 Nachweis der homologen Rekombination mit den externen und der internen Sonde

Für die Analyse wurde die DNS mit den in Abbildung 4-5 und 4-6 beschriebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und 10µg auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden zum einen Vektoren mit den enthaltenen Hybridisierungsstellen und unverdaute BAC- DNS verwendet, als Negativkontrolle wurde BAC- DNS ohne den *foxp3*- Locus verwendet. Für die Vektorkontrollen wurden Plasmid- DNS mit Restriktionsendonukleasen so behandelt, dass die Kontrolle auf der gleichen Höhe wie das erwartete Signal läuft.

Die 5' Sonde zeigte bei allen Klonen nur das WT- Signal von 5,7 kb (vgl. Abbildung 4-7) und die 3' Sonde das WT- Signal von 2,6 kb (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht im direkten Widerspruch zu dem erhaltenen, richtigen Signal mit der internen Sonde. Die interne Sonde zeigte bei den drei getesteten Klonen des BACs 362 das erwartete 6,9 kb Signal (vgl. Abbildung 4-7/rechts).

Um diese unterschiedlichen Ergebnisse besser deuten zu können, wurden zwei Klone, jeweils ein Klon je BAC, welche mit der internen Sonde positiv getestet wurden, sequenziert.

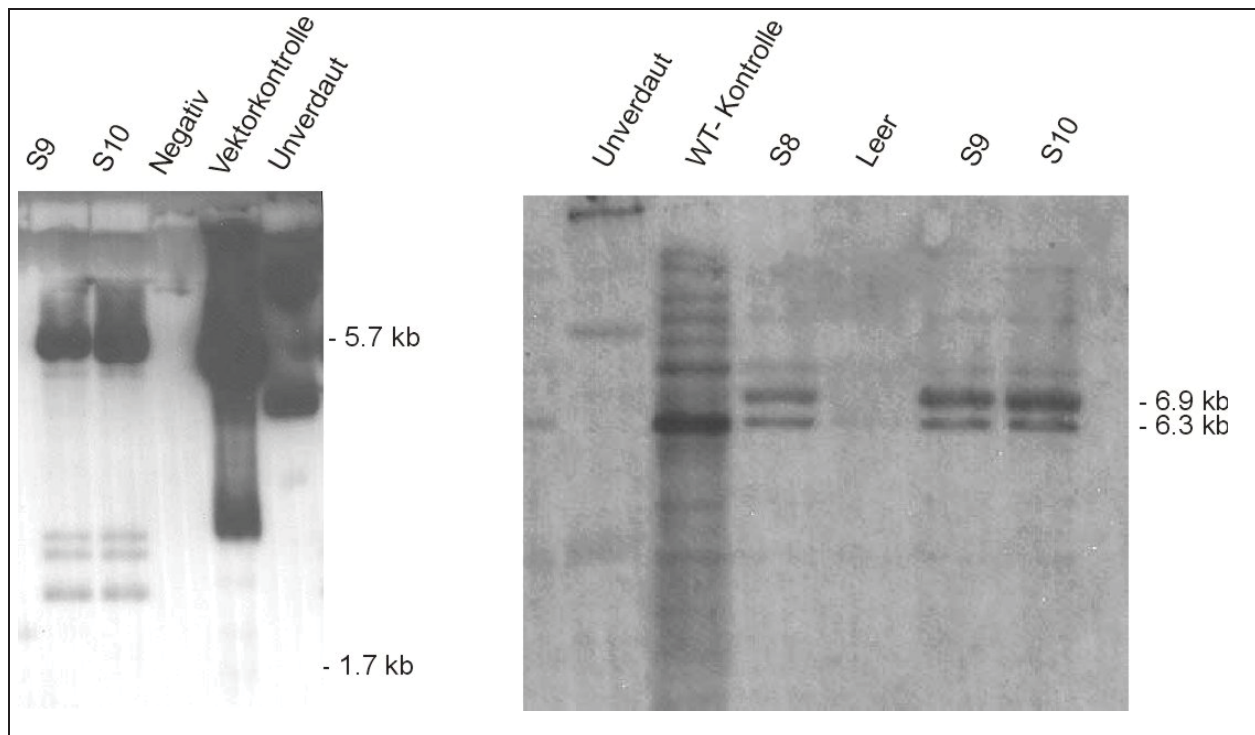


Abbildung 12: Southern Blot Analyse mit der 5'externen und internen Sonde

Links: Hybridisierung des Southern Blot mit der 5'externen Sonde; Vektorkontrolle und Klone S9 und S10 zeigen das 5,7kb WT- Signal, das 1,7kb Signal für den mutierten Locus fehlt bei den Klonen S9 und S10, die negativ Kontrolle (BAC- DNS ohne Foxp3) zeigt wie erwartet kein Signal und unverdaute BAC- Klone zeigen ein Signal für die Sonde auf falscher Höhe an.

Rechts: Hybridisierung mit der internen Sonde; die unverdaute BAC- DNS zeigt ein Signal für die Sonde auf der falschen Höhe an; die Vektorkontrolle zeigt das 6,9kb Signal des mutierten Locus; die Klone S8, S9 und S10 zeigen ebenfalls das 6,9kb Signal des mutierten Locus.

4.1.4.3 Sequenzierungsanalyse der Klone

Für die Sequenzierung wurden zum einen Primer genutzt, um aus dem *foxp3*- Locus in den mutierten Bereich zu sequenzieren und weitere Primer, die die Sequenzierung aus dem Insert heraus in den WT *foxp3*- Locus ermöglichten (vgl. Tabelle 2-4). So sollte festgestellt werden, ob die Rekombination des Zielgenvektors an der richtigen Stelle stattgefunden hat und ob eine vollständige Rekombination erfolgt ist.

Anhand der ermittelten und in Abbildung 4-8 dargestellten Sequenzierungsdaten eines Klons wurde deutlich, dass es nicht an der richtigen Stelle zu einer Rekombination gekommen ist. Der andere analysierte Klon zeigt das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

```

GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGCCCCG GGAAGTTCCT ATACTTTCTA
GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGCCCCG GGAAGTTCCT ATACTTTCTA
GAGAATAGGA ACTTCGGAAT AGGAACTTCG TAACCGTTCG TACGAGAATG GATCCAGGCC
GAGAATAGGA ACTTCGGAAT AGGAACTTCG TAACCGTTCG TACGAGAATG GATCCAAGCC
AGCCAAGCCT ATGGCTCCTT CTTGGCCCT TGGCCCATCC CCAGGAGTCT TGCCAAGCTG
    TAT    T ATGGCTCCTT CTTGGCCCT TGGCCCATCC CCAGGAGTCT TGCCAAGCTG
GAAGACTGCA CCCAAGGGCT CAGAACTTCT AGGGACCAGG GGCTCTGGGG GACCCTTCCA
GAAGACTGCA CCCAAGGGCT CAGAACTTCT AGGGACCAGG GGCTCTGGGG GACCCTTCCA
AGGTCGGGAC CTGCGAAGTG GGGCCACAC CTCTTCTTCC TTGAACCCCC TGCCACCATC
AGGTCGGGAC CTGCGAAGTG GGGCCACAC CTCTTCTTCC TTGAACCCCC TGCCACCATC
CCAGCTGCAG GTGAGGCCCG GGGCCAGAA TGGGGTAAGC AGGGTGGGGT ACTTGGGCCT
CCAGCTGCAG GTGAGGCCCG GGGCCAGAA TGGGGTAAGC AGGGTGGGGT ACTTGGGCCT
ATAGGTGTCG ACCTTTACTG TGGCATTGCG CGGGGGTTGG GGGGGTGCT GGGAAACAGG
ATAGGTGTCG ACCTTTACTG TGGACTAGTT CTAGAGCGGC CGCCACCGCG GTGGAGCTCC
AAGTGGTTTA TGGGTCCCAG GCAAGTCTGA CTTATGCAGA TATTGCAGGG CCAAGAAAAT
AGCTTTTGTG CCCTTTAGTG AGGGTTAATT GCGCGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG
CCCCACTCTC CAGGCTTCAG AGATTCA
TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTC

```

Abbildung 13: Ergebnisse der Sequenzierungsanalyse

Obere Sequenz: Original- Sequenz aus *foxp3*- Lokus und dem Zielgenvektor

Untere Sequenz: Daten der Sequenzierung

Kursiv und rot: Foxp3- Sequenz downstream der 3' homologen Region

Fett: 3' homologe Region

Gelb unterlegt: Sequenz des Zielgenvektors

Blau: Mismatch der Sequenzierung zur Originalsequenz

Die Sequenz downstream der 3' homologen Region ist nicht an der richtigen Stelle in dem BAC zu finden. Des Weiteren wurden Lücken und fehlerhafte Sequenzabschnitte beim Übergang von der 3' homologen Region in die Sequenz der dualen Selektionskassette gefunden. Im 5' Bereich des Zielgenvektors traten noch größere Differenzen auf (Daten nicht gezeigt). Auch der Übergang vom Zielgenvektor in den upstream WT- Foxp3- Bereich zeigte nicht die vorgegebene Sequenz. Die Sequenzierungsdaten unterstreichen auch die Ergebnisse mit der Southern- Blot- Analyse. Die Sequenz für die interne Sonde und auch die nötigen Schnittstellen sind vorhanden und somit zeigte diese das erwartete Signal. Die externen Sonden konnten nicht die richtigen Banden für den mutierten

Lokus zeigen, da die Rekombination nicht an der vorgesehene Stelle im BAC statt gefunden hatte und somit noch immer die WT Sequenz vorhanden war.

4.1.5 Analyse der DEREK- Maus

Parallel zu unserem negativen Sequenzierungsergebnis erhielten wir von der Arbeitsgruppe von Tim Sparwasser (TU München) ein Kooperationsangebot, um mit einer dort generierten Reportermaus zu arbeiten. Diese Maus ist ebenfalls eine BAC- transgene Maus, die im ersten Exon des *foxp3*- Lokus die kodierende Region des eGFP sowie den kodierenden Bereich des Diphtheria Toxin Rezeptors (DTR) enthält [37] . Der DTR bietet einem die Möglichkeit, Foxp3- exprimierende Zellen gezielt durch die Gabe von Diphtheria- Toxin (DT) zu deletieren. Die Maus wurde DEREK- Maus (depletion of regulatory Tcells) genannt.

4.1.5.1 Analyse der Foxp3⁺ T- Zellen in der DEREK- Maus

Als erstes wurde überprüft, ob die DEREK- Maus einen normalen Phänotyp einer C57BL/6 Maus zeigt, da der BAC durch seine zufällige Integration in das Genom der Maus ein wichtiges Gen der Maus deletiert haben kann. Es wurden weder im Verhalten noch in der Zucht Auffälligkeiten entdeckt, die DEREK- Maus agiert wie eine WT C57BL/6 Maus. Erste Versuche, dargestellt in Abbildung 4-9, wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Foxp3- Expression mit der GFP- Expression korreliert. Dieses war notwendig, da der BAC im Genom der Maus zufällig integriert und somit unter die Kontrolle eines starken Promoters bzw. Silencer geraten sein kann. In diesem Fall würde die GFP- Expression stärker bzw. schwächer als die Foxp3- Expression ausfallen.

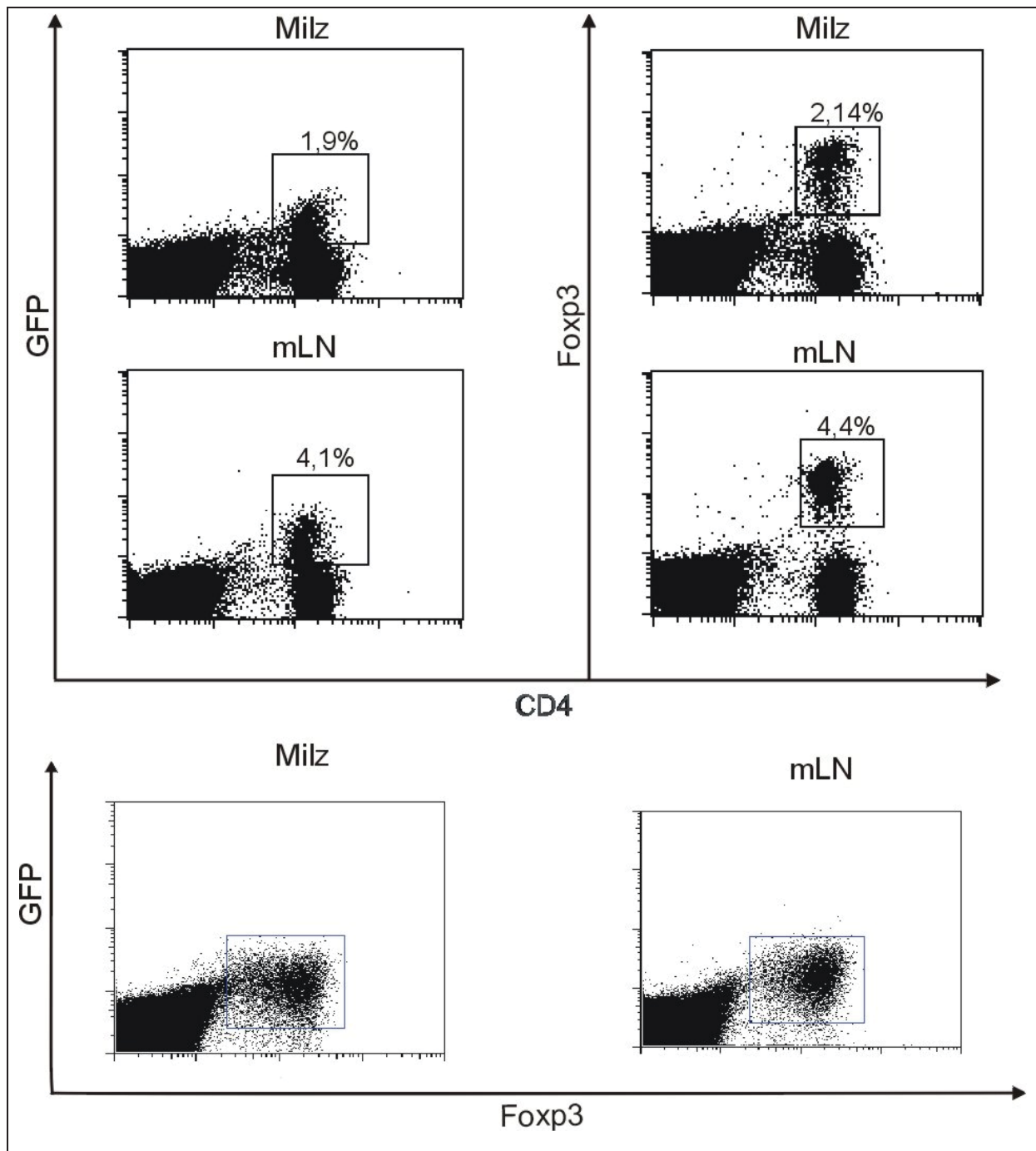


Abbildung 14: Analyse der Foxp3⁺ T- Zellen

DEREG Tieren wurden Milz und mLN entnommen und auf die Moleküle CD4 und Foxp3 gefärbt; dargestellt sind alle Lymphozyten in Bezug auf ihre CD4, GFP und Foxp3 Färbung; umkreiste T- Zellen sind die jeweils GFP bzw. Foxp3⁺ T- Zellen oder GFP/Foxp3 doppel positiven; Prozentangabe entspricht dem Vorkommen der Foxp3⁺ und GFP⁺ T- Zellen in den gesamten Lymphozyten des entsprechenden Organs.

In Abbildung 4-9 ist zu erkennen, dass die Foxp3- und GFP- Expression in der Milz und im mLN mit annähernd gleicher Prozentzahl auftritt. Der Prozentsatz der GFP⁺- T- Zellen scheint weniger zu sein, da die Fluoreszenz des Markers GFP schwächer ist, als die der Foxp3- Färbung und die Abgrenzung

der GFP⁺ und GFP⁻ T- Zellen schwerer ist. Die beiden Populationen gehen im Gegensatz zur Foxp3-Färbung in einander über und dadurch ist die genaue Prozentzahl schwer bestimmbar und kann Schwankungen aufzeigen. Bei der Darstellung der Foxp3⁺ gegen die GFP⁺ T- Zellen kann man aber erkennen, dass alle GFP⁺ T- Zellen auch Foxp3⁺ sind. Weiterhin wurden noch die pLK, Peyers Patches, IELs und der Thymus analysiert. Die gleichen Beobachtungen wie in Milz und mLKs konnten auch in diesen Organen gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.5.2 Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen

Nachdem gezeigt worden war, dass das Expressionsmuster unseren Erwartungen entsprach, wurde die Funktionalität des DTRs analysiert. In diesem Abschnitt wurde die Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen mittels Diphtheria- Toxin (DT) überprüft. Hierfür wurde DERE- Mäusen an zwei aufeinander folgenden Tagen, Diphtheria Toxin i.p. gespritzt. Am Tag 1 nach DT- Gabe wurden Milz, mLK, pLK, PP, IEL und Thymus der Mäuse auf die Expression von GFP und Foxp3 analysiert.

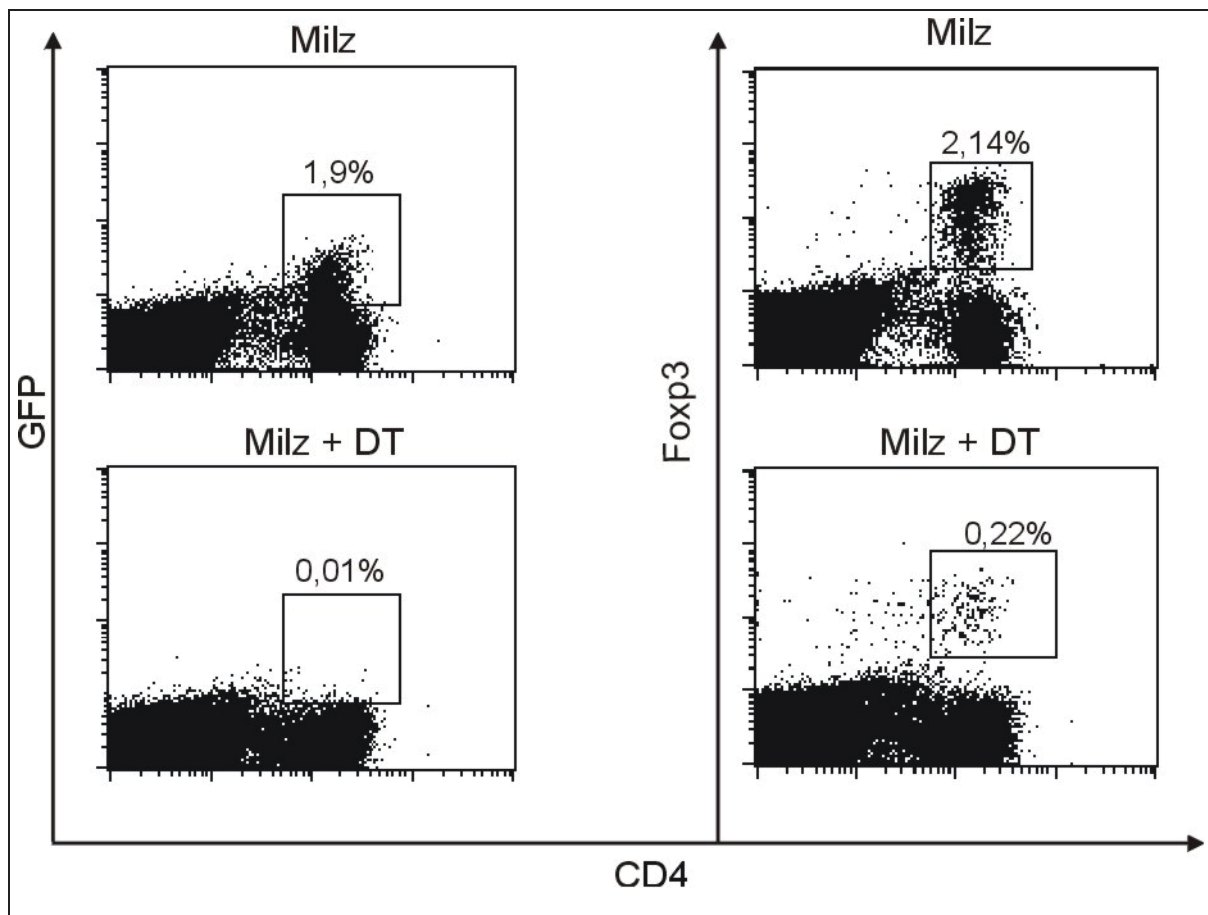


Abbildung 15: Depletion der Foxp3⁺ bzw. GFP⁺ T- Zellen in DEREK Mäusen

Den Mäusen wurde alle 24 h 1µg Diphtheria Toxin (DT) i.p. gespritzt. Nach zweimaliger DT- Gabe wurden die Milzen der Mäuse entnommen und die Foxp3- und GFP- Expression untersucht; in den umrandeten Bereichen liegen die GFP- bzw. Foxp3- positiven T- Zellen; Prozentangabe entspricht dem Vorkommen der Foxp3⁺- und GFP⁺ T- Zellen in den gesamten Lymphozyten des entsprechenden Organs.

Nach der Diphtheria- Toxin Gabe wurden, wie in Abbildung 4-10 für die Milz dargestellt, die GFP- sowie Foxp3- positiven T- Zellen depletiert. Auffällig ist, dass ein Teil der Foxp3⁺ T- Zellen nicht mit depletiert wurden. Dieser Anteil der Foxp3⁺ T- Zellen wurde im Gegensatz zu allen GFP⁺ T- Zellen durch die Gabe von DT nicht depletiert. Bei allen überprüften Organen war die gleiche Entwicklung zu beobachten.

4.1.5.3 Vergleich der Diphtheria- Toxine von Merck und Sigma zur Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen

Im weiteren Verlauf der Arbeit trat eine Diskrepanz zwischen unseren Analysen der DEREK- Maus und den Analysen einer weiteren existierenden BAC- transgenen Maus auf, welche ebenfalls unter der Kontrolle des Foxp3- Promoters den DTR exprimiert. Diese Diskrepanz zeigte sich bei dem Phänotyp der DEREK- Maus nach DT- Gabe [37] ; [36] .

Bei einer näheren Überprüfung des Depletionsprotokolls mit unserem eigenen Protokoll [37] fielen als wichtigste Unterschiede die Herstellerfirma des DTs sowie das Schema der Verabreichung des DTs (jeden zweiten Tag im Gegensatz zu jedem Tag) auf. In dem in Abbildung 4-11 dargestellten Versuch wurden das DT von Merck und Sigma miteinander verglichen. C57BL/6 Kontrolltieren und DEREK- Tieren wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen jeden zweiten Tag genau nach dem Protokoll von Kim *et al.* [36] DT verabreicht. Zunächst wurde der optische Zustand der Mäuse (Fell, körperliche Verfassung) und ihre Gewichtsentwicklung kontrolliert.

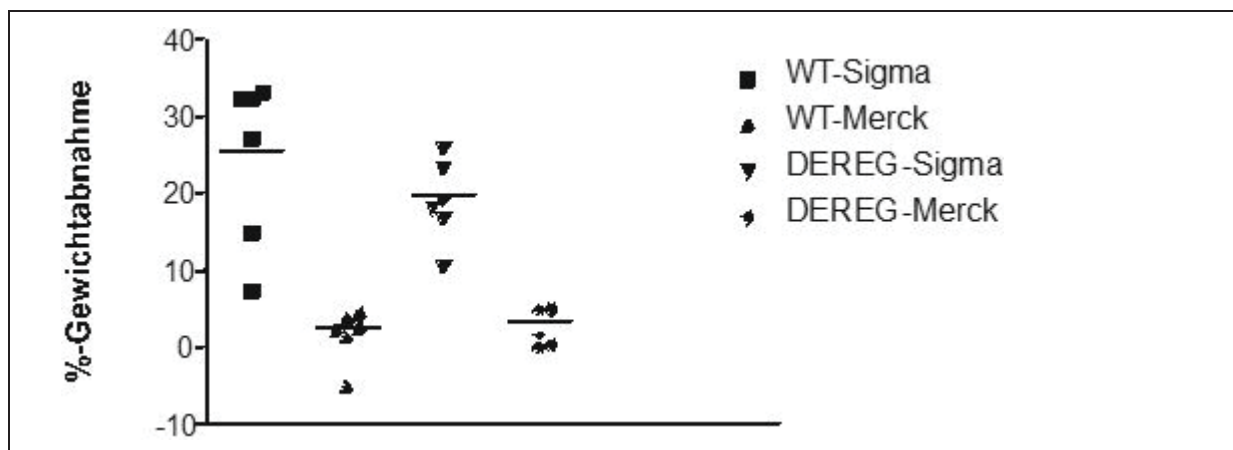


Abbildung 16: Gewichtsabnahme der Mäuse bei Diphtheria Toxin- Behandlung

C57BL/6 und DEREK- Tieren wurden jeden zweiten Tag 1µg DT i.p. gespritzt; an diesen Tagen wurde auch das Gewicht der Mäuse überprüft; der Versuch wurde an Tag 14 abgebrochen, da die Kontroll- und DEREK- Tiere, welche mit Sigma DT behandelt worden waren, zu große Gewichtsabnahmen aufwiesen.

Nach 14 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, weil die Mäuse, welche das DT von Sigma bekommen hatten, einen Gewichtsverlustes von mehr als 20% aufwiesen (vgl. Abbildung 4-11). Dieser Gewichtsverlust konnte ausschließlich bei den Tieren, welche mit Sigma DT behandelt worden waren, beobachtet werden, interessanterweise auch bei den Kontrolltieren, bei denen keine Depletion der Tregs erfolgte. Die Tiere, welche mit Merck DT behandelt worden waren, zeigten diese massive Gewichtsabnahme nicht. Die Milzen und Lks, der mit Sigma DT behandelten Tiere waren im

Vergleich zu den mit Merck DT behandelten Tieren leicht vergrößert (Daten nicht gezeigt). Eine spätere histologische Untersuchung zeigte weiterhin, dass bei allen DEREK- Tieren im Gegensatz zu den Kontrolltieren ein beginnender „scurfy“- Phänotyp feststellbar ist, was den Schluss zulässt, dass beide DTs in Bezug auf die Depletion der Tregs wirksam waren.

4.2 Analyse von Foxp3⁺ T- Zellen

In diesem Teilabschnitt wurden erste Schritte zur Analyse der Stabilität des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 unternommen. Es wurde die Stabilität der Expression des Transkriptionsfaktor Foxp3 in T- Zellen *in vivo* sowie die suppressorische Kapazität von Foxp3⁺ T- Zellen *in vitro* überprüft. Im Zuge der Analyse der suppressorischen Kapazität wurde die Induzierbarkeit des Transkriptionsfaktors unter unterschiedlichen Kulturbedingungen *in vitro* analysiert.

4.2.1 Stabilität von Foxp3 *in vivo*

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur sehr wenige Informationen über die Regulation und Stabilität der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3. Es war nicht klar, ob die Expression *in vivo* stabil ist oder CD4⁺CD25⁺ T- Zellen Foxp3⁺ im Zuge z.B. einer Infektion hochregulieren und nur eine transiente Expression des Transkriptionsfaktors vorliegt. Zunächst wurde die Stabilität der Foxp3- Expression in CD4⁺CD25⁺ T- Zellen *in vivo* überprüft. Hierfür wurden aus BALB/c Mäusen CD4⁺CD25⁺ T- Zellen mittels MACS- Aufreinigung isoliert. Es wurden BALB/c- Mäuse für die Isolierung der CD4⁺CD25⁺ T- Zellen genutzt, da zu diesem Zeitpunkt die DEREK- Mäuse noch nicht generiert worden waren. Diese CD4⁺CD25⁺ T- Zellen, wurden mit CFSE markiert, um sie nach einem adoptiven Transfer in der Reanalyse wiederzufinden. Die markierten Zellen wurden i.v. in syngene BALB/c Mäuse gespritzt, somit kann es zu keinen Kompatibilitätsproblemen und damit zu einer Eliminierung der adoptiv transferierten Zellen kommen. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse getötet und in Milz, pLK und mLK die Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen murines Foxp3 gefärbt und anschließend die CFSE⁺ transferierten Zellen analysiert. Es konnte im Zuge dieser Färbung der Anteil der Foxp3⁺ T- Zellen unter den CFSE⁺ T- Zellen mit dem Anteil der Foxp3⁺ T- Zellen vor dem adoptiven Transfer verglichen werden.

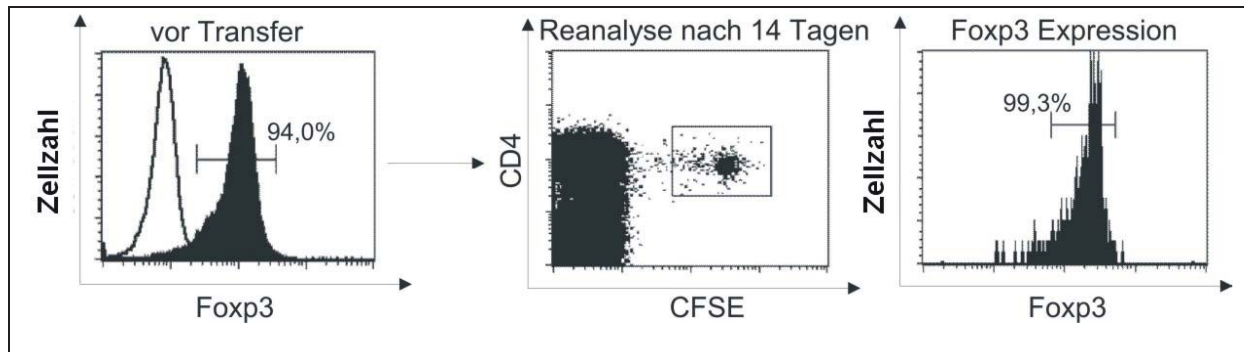


Abbildung 17: Analyse der Stabilität Foxp3⁺ T- Zellen *in vivo*

CD4⁺CD25⁺ *ex vivo* isolierte T- Zellen von Milz und Lk wurden mit CFSE markiert und in syngene Mäuse i.v. gespritzt (2*10⁶ T- Zellen/Maus). Vor dem Transfer wurden die CD4⁺CD25⁺ T- Zellen (schwarz) im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ T- Zellen (weiß) auf Foxp3 gefärbt. Nach 14 Tagen wurden die reisolierten Zellen CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt. Im mittleren Blot ist die Unterscheidung zwischen endogenen und adoptiv transferierten Zellen zu erkennen; es wurden nur die CFSE⁺ Zellen auf ihre Foxp3- Expression analysiert (rechtes Histogramm).

In Abbildung 4-12 kann man sehr gut erkennen, dass die Foxp3⁺ T- Zellen stabil in ihrer Foxp3- Expression bleiben. Vor dem Transfer zeigte sich eine Foxp3- Färbung von 94 % der isolierten CD4⁺CD25⁺ T- Zellen, welche in der Reanalyse nach 14 Tagen auf 99,3% angestiegen war.

4.2.2 Stabilität korreliert mit demethylierten CpGs in konservierter Region im Intron

I

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Korrelation der Foxp3- Expression und der Demethylierung der TSDR im ersten Intron des *foxp3*- Locus existiert. Durch die Zugabe von TGF-β in Kulturen mit naiven Foxp3⁺CD4⁺ T- Zellen kann die Expression von Foxp3 induziert werden. Entzieht man den Kulturen in der restimulation das TGF-β, verlieren die Zellen ihre Foxp3- Expression. Diese TGF-β induzierte Foxp3- Expression ist jedoch instabil.

In Abbildung 4-13 ist die Induzierbarkeit der Foxp3- Expression in CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T- Zellen mittels TGF-β dargestellt. Die Zugabe von TGF-β im Laufe einer sechs tägigen Kultur mit additiven TZR- Stimulus führt zu einer hohen Foxp3- Expression (82,6%). In den Kulturen ohne die Zugabe von TGF-β, nur in Anwesenheit eines TZR- Stimulus konnte nur eine sehr geringe Foxp3- Expression beobachtet werden (13,2%). Die geringe Foxp3- Expression geht nach Restimulation und weiteren sechs Tagen Kultur unter neutralen Bedingungen wieder zurück. In den Kulturen mit der TGF-β- Stimulation und der hohen Foxp3- Expression geht die Foxp3- Expression nach der Restimulation in Abwesenheit von TGF-β ebenfalls zurück. In diesem Experiment erfolgte die Reduktion von 82,6% auf 36,6% (vgl. Abb. 4-13). Bei der beobachteten Reduktion liegt kein Auswachsen der 17,4% CD25⁻ Foxp3⁻ T- Zellen vor (getestet von Julia Polansky; Daten nicht gezeigt). Die Reduktion der Foxp3-

Expression zeigt auf, dass in den durch TGF- β induzierten Kulturen keine stabile Foxp3- Expression vorliegt. In weiteren unter gleichen Bedingungen gelaufenen Kulturen konnte die Foxp3- Expression auch noch weiter reduziert werden. Die Foxp3- Expression bzw. vor allem die Reduktion der Expression in den Induktionskulturen mittels TGF- β unterliegen aber starken Schwankungen. Die Reduktion lag zwischen 6% und 45% (Daten nicht gezeigt).

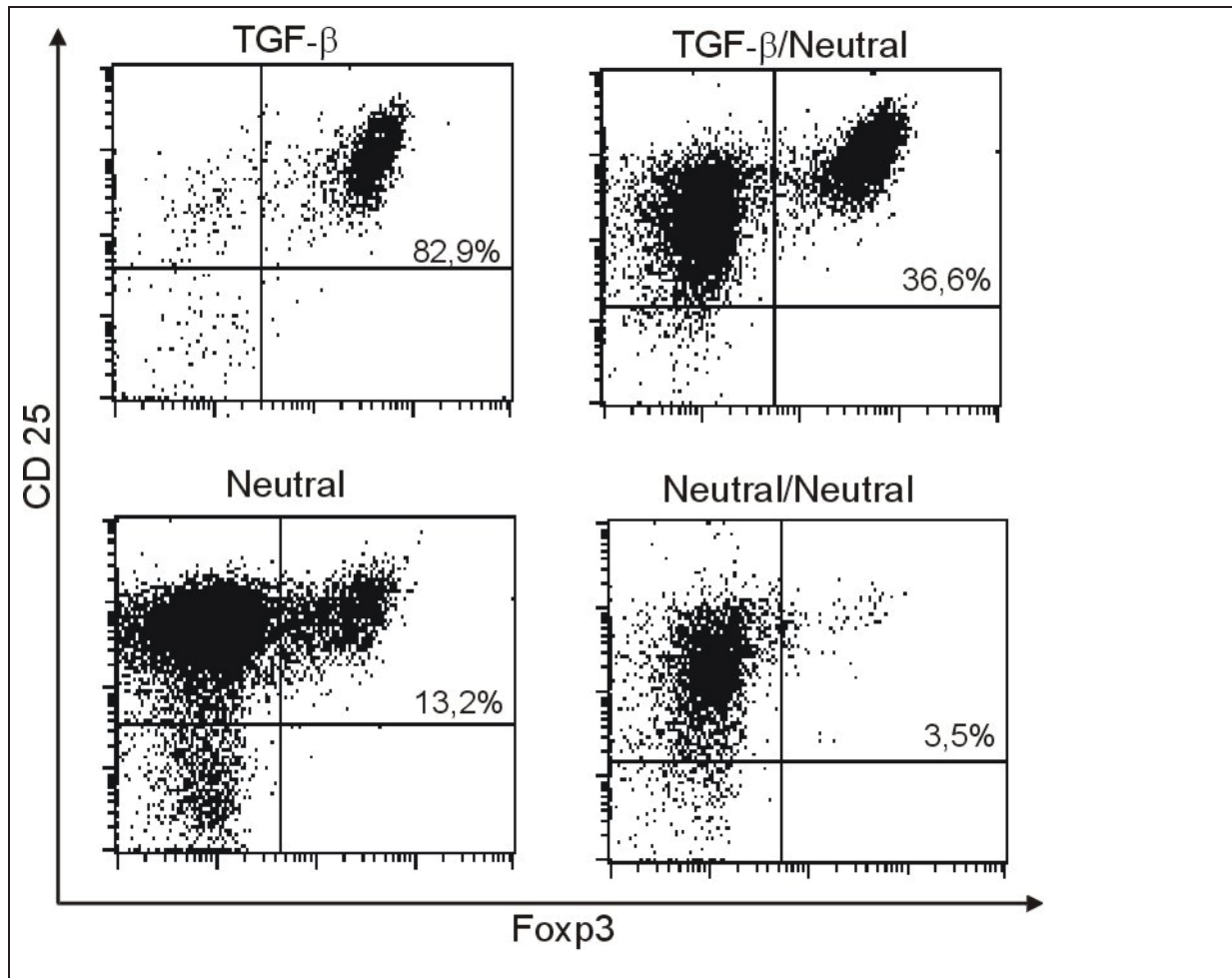


Abbildung 18: Foxp3- Expression unter unterschiedlichen Kulturbedingungen

Die T- Zellen wurden unter den in 3.15.7 beschriebenen Kulturbedingungen für sechs Tage und 12 Tage in An- und Abwesenheit von TGF- β kultiviert; dargestellt sind die CD4⁺ T- Zellen; auf der Y- Achse ist die CD25- und auf der X- Achse die Foxp3- Färbung abgebildet; Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Foxp3⁺ T- Zellen in der gesamten CD4- Population.

Ähnlich wie den in der Einleitung dargestellten Ergebnissen der Methylierungsanalyse von *ex vivo* isolierten CD25⁻ und CD25⁺ T- Zellen [102] wurden in dieser Arbeit die induzierte, instabile Foxp3- Expression in induzierten Tregs ebenfalls auf das Methylierungsmuster der TSDR hin analysiert. *Ex vivo* isolierte Tregs zeigten nicht nur einen stabilen Phänotyp *in vivo*, sondern zeigten auch eine deutliche Demethylierung der in Floess *et al.* beschriebenen TSDR (Treg specific demethylated Region). Das Methylierungsmuster der TSDR wurde auch bei den TGF- β induzierten Tregs

untersucht. Hierdurch sollte geklärt werden, ob eine Demethylierung für eine stabile Foxp3-Expression notwendig ist (vgl. Abbildung 4-14).

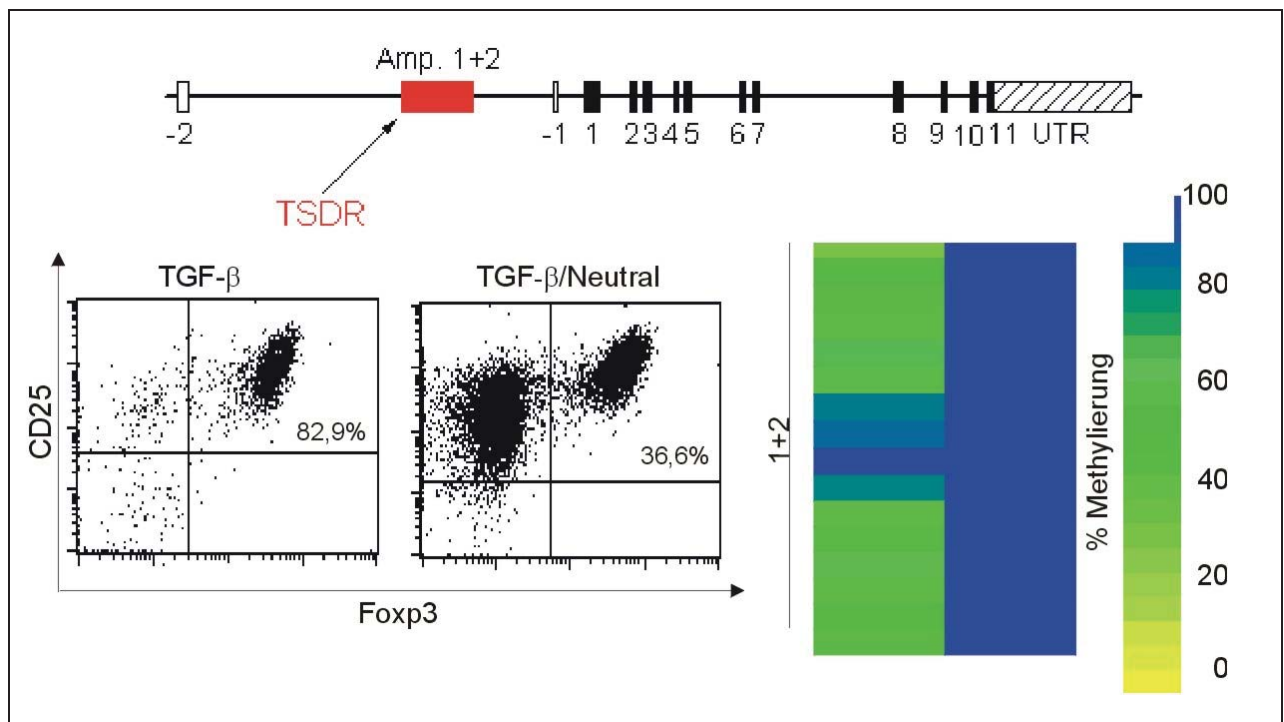


Abbildung 19: **Methylierungsstatus von sechs Tage bzw. zwölf Tage kultivierten T- Zellen in An- und nach Restimulation in Abwesenheit von TGF- β**

Oben: graphisch dargestellter Foxp3 Lokus mit der TSDR (Entspricht Amplikon 1 und 2); -2 bis 11 Exonstruktur des *foxp3*- Lokus.

Unten: Es wurden mittels MACS- Sortierung CD25⁺ T- Zellen *ex vivo* isoliert, die T- Zellen wurden in An- (TGF- β) und nach Restimulation in Abwesenheit (TGF- β /Neutral) von TGF- β kultiviert und die Foxp3- Expression analysiert (FACS-Blot); rechts davon Methylierungsanalyse der Amplikone eins und zwei, ein Kästchen entspricht einem analysierten CpG; Index für den Methylierungsstatus; gelb = vollständig demethyliert, blau = vollständig methyliert.

Die Foxp3- Expression bei den in An- und nach Restimulation in Abwesenheit von TGF- β kultivierten T- Zellen zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kulturen. In Abbildung 4-14 ist zu erkennen, dass die sechs Tage in Anwesenheit von TGF- β kultivierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, welche nach der Restimulation in Abwesenheit von TGF- β kultiviert wurden, ein nicht so deutliches, differentielles Methylierungsmuster zeigen wie es bei den Vergleich von CD25⁺ und CD25⁻ T-Zellen zu sehen war. Es ist zu erkennen, dass die durch TGF- β induzierte Foxp3- Expression mit der leichten Demethylierung korreliert, aber die Demethylierung nicht vollständig erfolgte. Der Verlust der Foxp3- Expression nach Restimulation in Abwesenheit von TGF- β korreliert mit dem Methylierungsstatus, die TSDR ist, wie in Abbildung 4-14 zu erkennen, wieder komplett methyliert.

Der Unterschied zwischen dem Methylierungsmuster bei Amplikon eins und zwei bei *ex vivo* isolierten CD25⁻ und CD25⁺ T- Zellen und bei in An- und Abwesenheit von TGF- β induzierten Tregs kann für eine Korrelation der Demethylierung mit der Stabilität der Foxp3- Expression sprechen.

Im Gegensatz zu der in der Einleitung dargestellten Methylierungsanalyse ist hier nicht die Analyse von Amplikon drei und vier durchgeführt worden, da diese schon bei den *ex vivo* T- Zellen keine Unterschiede im Methylierungsmuster zeigten.

4.2.3 Foxp3- Expression korreliert mit suppressiver Kapazität

In weiterem Verlauf dieser Arbeit wurden die suppressorischen Eigenschaften der unterschiedlichen Zellpopulationen, welche Foxp3 exprimieren, überprüft (vgl. Abbildung 4-13). Hierfür wurden *ex vivo* isolierte CD4⁺CD25⁺ T- Zellen mit induzierten Tregs oder neutral kultivierten T- Zellen in einem *in vitro* Suppressions- Test miteinander verglichen. Bei den induzierten Tregs wurde, wie schon in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 zwischen Zellpopulationen unterschieden, welche nur in Anwesenheit von TGF- β und welche, die in der Restimulation in Abwesenheit von TGF- β kultiviert wurden. In dem in Abbildung 4-15 dargestellten Test wurden naive CD4⁺CD25⁻ T- Zellen zusammen mit den zu untersuchenden T- Zellen in einem Verhältnis von 1:1 (Treg : naiven Zellen) für 72h kultiviert. Die Zellen wurden mit löslichem anti CD3 und APZ stimuliert. Das suppressorische Potential der induzierten und *ex vivo* isolierten T-Zellen wurde an Hand der Proliferation der naiven CFSE-markierten T- Zellen analysiert.

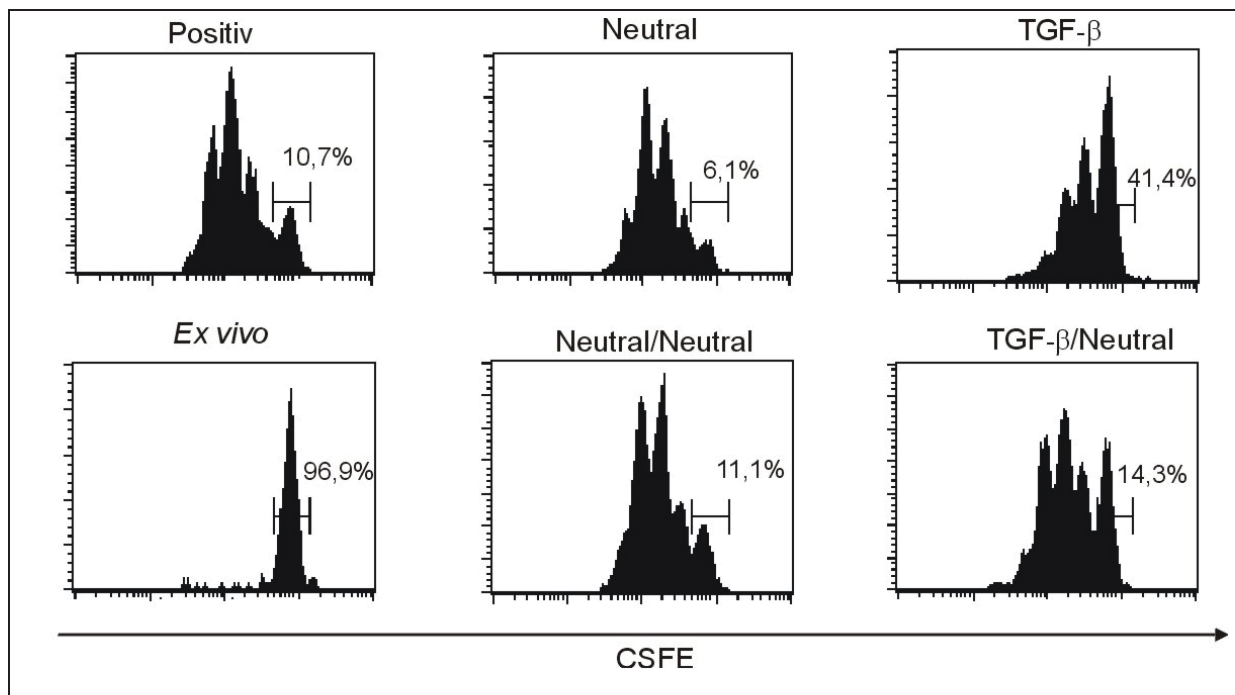


Abbildung 20: Analyse der suppressorischen Eigenschaften der unterschiedlich Foxp3 exprimierenden T- Zellen

CD4⁺CD25⁻ T- Zellen wurden wie in Kapitel 3.15.7 beschrieben für eine bzw. zwei Wochen kultiviert. Naive CD25⁻CD62L^{high}CD4⁺ CFSE markierte T- Zellen wurden mit löslichem anti CD3 und CD90 depletierten APZ kultiviert. Zur Auswertung der suppressorischen Eigenschaften wurde die Teilungsrate der naiven Zellen herangezogen, die durch die Ausdünnung der CFSE- Markierung (X- Achse) in den naiven Zellen bestimmt werden kann, Prozentangebe bezeichnet den Anteil der nicht proliferierten naiven T- Zellen. Positive Kontrolle sind naive Zellen ohne regulatorische Zellen.

In diesem *in vitro* Test konnte festgestellt werden, dass die suppressorische Eigenschaft von T- Zellen mit der Foxp3- Expression korreliert. Die *ex vivo* isolierten Tregs lassen keinerlei Teilung der naiven Zellen zu. Die neutral kultivierten T- Zellen zeigen keine Foxp3- Expression (vgl. Abbildung 4-13) und auch keine Suppression der naiven Zellen (vgl. Abbildung 4-15). In Anwesenheit von TGF-β wird die Foxp3- Expression induziert, die T- Zellen zeigen eine Foxp3- Expression von ~ 96% (vgl. Abbildung 4-13) und eine erfolgreiche, aber weniger effektive Suppression der Proliferation der naiven Zellen als *ex vivo* Tregs. Im Gegensatz dazu haben die T- Zellen, welche nach der Restimulation in Abwesenheit von TGF-β kultiviert wurden und kaum eine Foxp3- Expression zeigten, kein suppressorisches Potential. Es besteht somit eine Korrelation zwischen der Foxp3- Expression und der suppressorischen Eigenschaften der T- Zellen.

4.3 Analyse der Regulation des murinen *foxp3*- Lokus

Ziel dieses Projektes war die Analyse des *foxp3*- Lokus in Bezug auf die Regulation von der Foxp3-Expression. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Regulation der Transkription und die damit im Zusammenhang stehenden Veränderungen der chromosomalen Strukturen.

4.3.1 Histon- Modifikationen korrelieren mit Foxp3- Expression

Ein wichtiger Schritt in der Analyse der Regulation der Transkription eines Gens ist die Untersuchung von möglichen Modifikationen der Histonstruktur.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Acetylierung der Histone H3 und H4 und die Tri- Methylierung des Lysin4 des Histon H3 untersucht. Diese Modifikationen kann man mit Hilfe eines ChIP- Tests (Chromatin- Immuno- Präzipitations- Test/vgl. Kapitel 3.14) überprüfen. Die eingesetzten Antikörper binden spezifisch an Histone mit den entsprechenden Modifikationen, danach erfolgt eine spezifische Präzipitation der Zielproteine mit der an sie gebundenen DNS. In einem nächsten Schritt wurden die Proteine von der DNS getrennt und diese mittels RTQ- PCR quantifiziert. Bei diesem Schritt wurde mit Primern für den hochkonservierten Bereich der TSDR gearbeitet (vgl. auch Kapitel 3.14 und Tabelle 2-4).

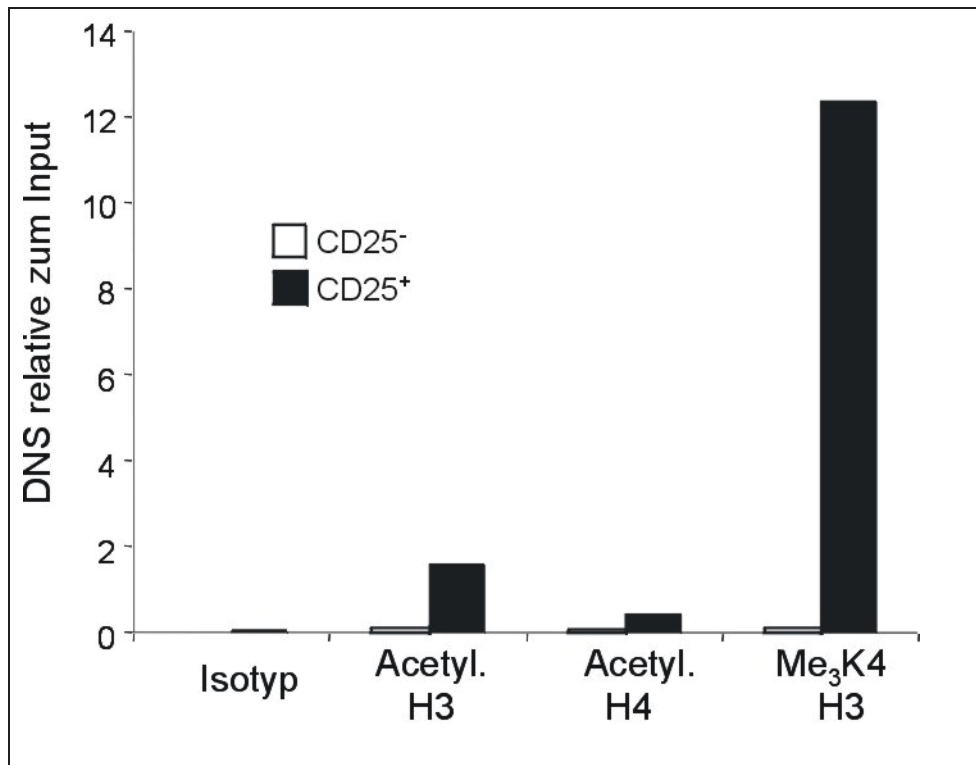


Abbildung 21: ChIP- Analyse der CD25⁺ versus CD25⁻ T- Zellen

Ex vivo isolierte CD25⁺ und CD25⁻ T- Zellen wurden per Chromatin- Immuno- Präzipitation- Test analysiert. Zur Präzipitation wurden ein Kontrollantikörper (Isotyp), sowie Antikörper gegen acetyliertes Histon 3 und Histon 4 und gegen tri- methyliertes Lysin 4 im Histon H3 verwendet. Anschließend wurden die Proben mittels RTQ-PCR analysiert, es wurden Primer für den hochkonservierten Bereich der TSDR genutzt. Die Quantifizierung erfolgte relativ zu der mitgeführten Input- Kontrolle.

Nach der Quantifizierung der Proben zur mitgeführten Input- Kontrolle wurde deutlich sichtbar, dass in CD25⁺ T- Zellen im Vergleich zu CD25⁻ T- Zellen die untersuchten Histon- Modifikationen im Bereich der TSDR vorliegen. Der stärkste Unterschied konnte bei der Methylierung des Lysins 4 des Histons 3 beobachtet werden, diese Histon- Modifikationen treten im Bereich der TSDR in *ex vivo* isolierten Tregs verstärkt auf (vgl. Abbildung 4-16).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Untersuchung der Histon- Modifikationen für einen offenen *foxp3*- Lokus im Bereich der TSDR bei CD25⁺ T- Zellen spricht. Dieser Befund unterstützt das gefundene Methylierungsmuster bei *ex vivo* isolierten CD4⁺CD25⁺ T- Zellen und spricht stark für einen offenen Lokus, welcher die Foxp3- Expression unterstützt.

4.3.2 Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen in der TSDR

Nach den gefundenen Histon- Modifikationen und dem unterschiedlichen Methylierungsmuster wurde als nächstes eine Datenbank unterstützte Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen- Analyse der TSDR durchgeführt. Dabei wurde ein 724 bp großes Fragment der TSDR ausgewählt, in dem alle CpGs liegen und eine Homologie von 77,3% zwischen Mensch und Maus vorliegt. Diese Einengung des untersuchten Bereiches hat zur Folge, dass eine überschaubare Menge von möglichen Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen vorhergesagt werden konnten. Für die Analyse wurden die Datenbanken von Genomatrix und biobase zu Grunde gelegt. Beide Datenbanken schlugen 100-150 mögliche Bindungsstellen vor. Zur weiteren Einengung wurden putative Bindungsstellen gewählt, welche in beiden Datenbanken gefunden worden waren und sich somit die Wahrscheinlichkeit der Bindung erhöht. Als zweites wurde mit Hilfe der Literatur analysiert, welche Transkriptionsfaktoren in der Immunologie, besonders in T-Zellen eine Rolle spielen können z.B. NF/κB [132] ; [133] oder NFAT [134] ; [135] ; [136] . Dafür wurde auch auf mögliche Signalwege, wie z.B. den TGF-β vermittelten Signalweg über die beteiligten SMAD- Faktoren geachtet. Nach diesen Schritten ist die weitere Analyse möglicher, bindender Transkriptionsfaktoren auf die in Abbildung 4-17 dargestellten Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen beschränkt worden.

1	AGGCTGACATTCCAGAGCC-----AGCAAGAGGCCTTATGGAGTTTAAAG	45
1	----tg--tttcag-gcctggtaggcaagaggccctatgaagcagcaag	43
NF/kappaB GATA-4		
46	CTTCCTGGCTTT-AGGTGGTTCCCATTTCTTTGGGC-TCTGGGACA----	89
44	ctgcctgactttcagatggttccaaggagtgttgacaccagggacactgg	93
Foxp3		
90	TCAAATACACACAGTAAGAAGGTGGATCCATGCACCCTACAGAGTCTGTGT	139
94	cc--tacacatactgagactttgggacgtagacc--cacagtctgtgg	139
C/EBPgamma TCF-4 C/EBPgamma		
140	TCTTGAGATTCTAAAATCGTTGGCTTTGAGAAATGATATCGTACAGTTC	189
140	ttttgagattctaggatcctttaaatctaagaaatgctgttctatgattc	189
TTF1/TCF-4		
190	TGAGTTTCTGTTACTACAGCATTTGAAGACTCAAGGSGGTCTCAATATCC	239
190	tgaggctcctgggtgttatactatttgaagacccca-ggggtcccagtatct	238
240	ATGAGGCCTGCCTAATACTCACCAAGCATCCAACCTTGGGCCCTCTGGC	289
239	gtggagcctgcctggcactctcagagcttcaaacctgggtcctctccaca	288
290	ATCCAAGAA-AGACAGAATCGATAGAACTTGGGTTTTG-CATGGTAGCCA	337
289	acccaagaagggccag-gtcttcagagctaggggttgctcatagtggcca	337
GATA-4 ATF/CREB c-Ets-1		
338	GATGGAAGTCACCTACCACATCCGCTAGCACCCACATCACCTACCTGGG	387
338	gatggacatcacctaccacatccaccagcaccatgtcacccacctggg	387
NF-kappaB STAT-1		
388	CCATATCCGGCTACAGGATAGACTAGCCACTTCTCGGAACGAAACCTGTGG	437
388	ccaagcctgctgcaggacagggcagccagtctcgggaacgaaacctgtgg	437
438	GGTAGATTATCTGCCCCCTTCTCTTCTCCTTGTGTCGATGAAGCCCAA	487
438	ggtgggttatctgccctcttctcttctcctcctggtgtcgatgaagcccg	487
c-Ets-1 CREB/ATF		
488	TGCATCCGCGCCCATGACGTCATATGGCAGAAAAATCTGGCCAAGTTC--	535
488	cgcatccggcgccatgacgtcaatggcggaataatctgggcaag-tcg	536
Foxp3 NFAT/Evi-1		
536	AGGTTGTGACAACAGGGCCAGATGTAGACCCGATAGGAAAACATATTC	585
537	gggctgtgacaacagggccagatgcagaccccgatataaaaacataatc	586
586	TATGTCCAGAAACAACCTCCATACAGCTTCTAAGAAA--CAGTCAAACA	633
587	tgtgtccagaaacatccccattcagcttctgagaaaccagtcagaaa	636
Elk-1 SMAD-4		
634	GGAAAGCCCCAACAGACAGTGCAGGAAGCTGGCTGGCCAGCCAGCCCTC	683
637	gggacgtcccaacagacagtgcaggaagcggtgcccagcccgccctc	686
SMAD-4		
684	CAGGTCC-CTAGTACCACTAGACAGACCATATCCAATTCAGG--	724
687	taggtcctc---taccgccagacagatcatctccatgtccctgt	727

Abbildung 22: Darstellung gefundener, möglicher Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen in der TSDR

Obere Sequenz ist die der Maus im Vergleich zur unteren humanen Sequenz, rot = gefundene CpGs in Mensch und Maus, eingerahmt mögliche Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen mit ihrer Bezeichnung; dargestellte Sequenz beginnt 358bp downstream des TSDR- Starts und endet 133bp upstream des TSDR- Endes.

4.3.3 Analyse der transkriptionalen Aktivität der TSDR

Für die Analyse der transkriptionalen Aktivität wurde die Methode des dualen Luciferase- Test gewählt. Es wurden unterschiedliche Konstrukte und Plasmide verwendet, um einen genauen Einblick in die transkriptionale Aktivität des *foxp3*- Lokus zu bekommen.

4.3.3.1 Analyse der unterschiedlichen Luciferasekonstrukte

Die in Abbildung 4-20 dargestellten Luciferasekonstrukte wurden in zwei unterschiedliche Plasmide mit der Bezeichnung pGL3- Basic und pGL3- Promoter eingebracht. Die beiden Plasmide sind von ihrem Aufbau fast identisch. Der einzige Unterschied zwischen den Plasmiden ist, dass der pGL3- Promoter im 5' Bereich des Luciferasegens einen schwachen, minimalen Promoter des Viruses Simian vacuolting 40 (SV 40) enthält. Der Vektor pGL3 Basic beinhaltet diesen minimalen Promoter nicht.

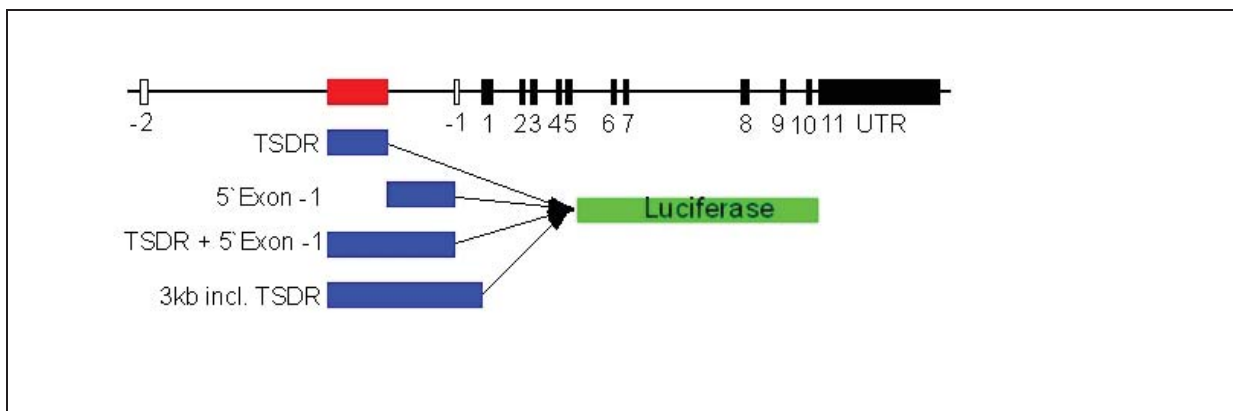


Abbildung 23: **Darstellung der Luciferasekonstrukte**

Dargestellt ist der *foxp3*- Lokus mit der TSDR (rot) und die Lage der unterschiedlichen klonierten Bereiche.

Blau: unterschiedliche Konstrukte zur Analyse der Region mit der TSDR

Grün: angedeutetes Luciferasegen

Links neben den blauen Konstrukten: verwendete Bezeichnungen im weiteren Verlauf der Arbeit

Dieser Unterschied zwischen den beiden Plasmiden ermöglicht, dass man eingebrachte Elemente auf unterschiedliche transkriptionale Aktivität testen kann. In dem pGL3- Basic ist nur eine Luciferase-Aktivität messbar, wenn das eingebrachte Konstrukt ein eigenständiger Promoter ist. Im pGL3- Promoter kann überprüft werden, ob es sich bei dem eingebrachten Element um einen Enhancer oder einen Silencer handelt. Bei dem Luciferase- Test werden die Zellen transfiziert und anschließend

stimuliert (vgl. 3.21). Man kann dann nach 24 bzw. 48 Stunden die Luciferase- Aktivität messen. Für die Festlegung des besten Zeitpunktes wurden ein erster Luciferase- Test mit dem Vektor pGL3- Promoter in der EL-4 T- Zelllinie (vgl. 2.8) durchgeführt und getestet, wann die Aktivität der Luciferase am höchsten ist.

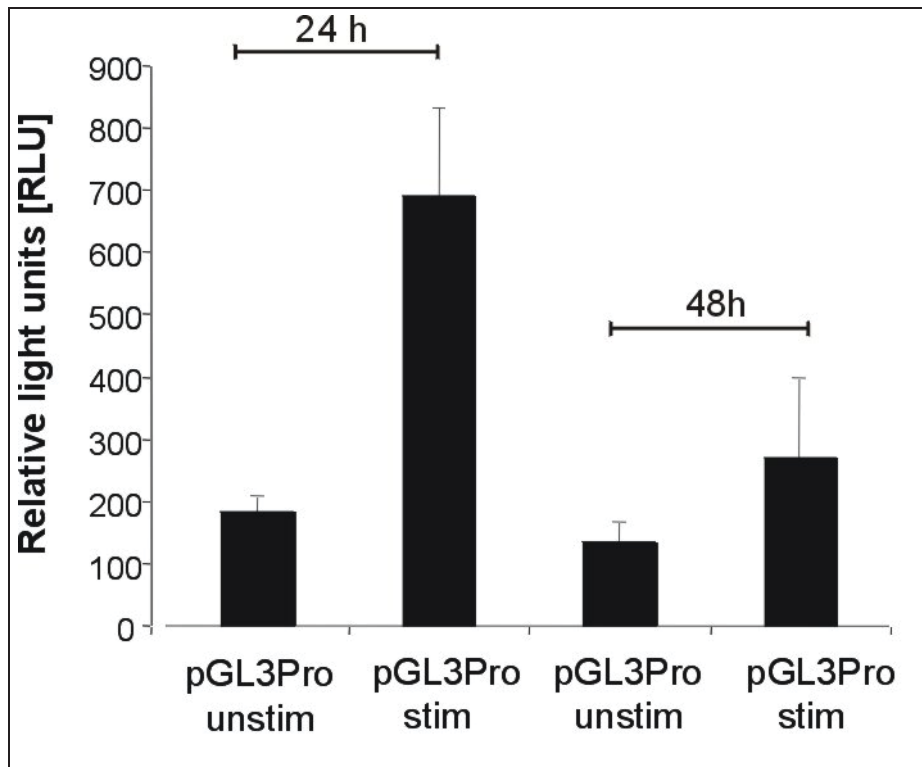


Abbildung 24: Analyse der Luciferase Aktivität nach 24 und 48 Stunden

Die Zelllinie EL-4 wurde mit dem Plasmid pGL3- Promoter transfiziert und für 24 Stunden stimuliert; der Assay wurde 24 Stunden und 48 Stunden nach Transfektion gemessen; RLUs auf interne pTKRenilla Kontrolle standardisiert; n=3; ein Experiment von drei unabhängigen dargestellt.

In Abbildung 4-19 wurde deutlich, dass nach 24 Stunden die Luciferase- Aktivität im Vergleich zu 48 Stunden am höchsten ist. Alle weiteren Analysen wurden in dem Zeitraum von 24 Stunden nach Stimulierung gemessen. Die RLUs sind in diesem Versuch nicht sehr hoch, weswegen noch weitere Zelllinien getestet werden sollten.

Für die Auswahl einer geeigneten Zelllinie wurde zuerst ihre Transfizierbarkeit getestet. In Abbildung 4-20 sieht man den Vergleich von EL-4- und humane Jurkat- Zelllinien nach erfolgreicher Nucleofektion mit den Plasmiden pGL3- Promoter und pGL3- Promoter- TSDR.

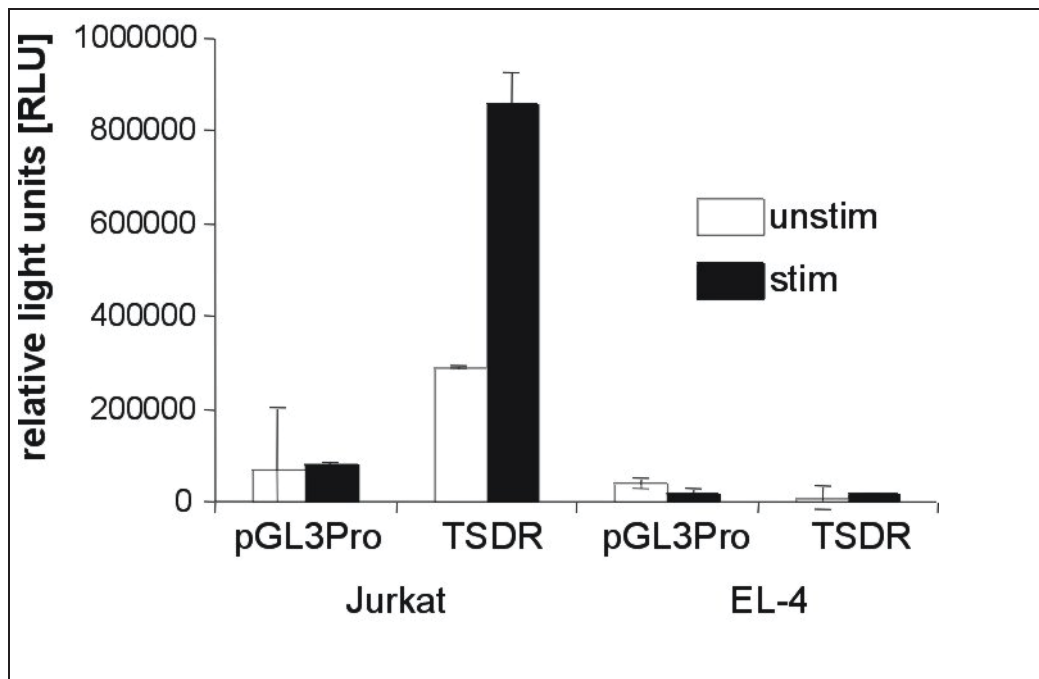


Abbildung 25: Vergleich der Transfektion von Jurkat und EL-4 Zellen

Transfektion von EL-4- und Jurkat- Zelllinien mit den pGL3- Promoter (pGL3Pro) und dem pGL3- Promoter-TSDR (TSDR), Zelllinien wurden nach Transfektion für 24 Stunden mit PMA stimuliert und dann mittels des dualen Luciferase- Tests analysiert; „Light units“ wurden auf die interne Kontrolle des pTKRenilla standardisiert; n=3.

Die humane Jurkat- Zelllinie zeigte eine gute Transfektionseffizienz und sehr hohe RLUs und eignet sich für die Durchführung des dualen Luciferase- Tests deutlich besser als die EL-4- Zelllinie. Zur gleichen Zeit wurden in unserem Labor mit weiteren Zelllinie die Amaxatechnik ausprobiert, dabei stellt sich heraus, dass die murine T- Zelllinie RLM-11 die gleiche gute Transfektionseffizienz und ebenso hohe RLUs aufzeigte wie die humane Jurkat- Zelllinie (getestet von Nils Grabole). Alle getesteten Zelllinien zeigten keine endogene Foxp3- Expression (Daten in unserem Labor erhoben). Somit wurde die Zelllinie mit der besten Transfektionsrate ausgewählt, welches bedeutet, dass die beiden Zelllinie RLM-11 und Jurkat genutzt werden konnten. Die Jurkat- Zelllinie ist eine human Zelllinie und die RLM-11 eine murine T- Zelllinie. Bei den Konstrukten der TSDR in den Luciferasevektoren handelt es sich um murine Konstrukte. Auf Grund dessen wurden alle weiteren Analysen in den RLM-11- Zellen durchgeführt und somit murine Konstrukte in eine murine Zelllinie transfiziert.

In der Abbildung 4-21 sind die Versuche mit den Plasmiden pGL3- Basic, pGL3- Promoter und den Konstrukten der TSDR dargestellt. Die Luciferase Aktivität wurde 24 Stunden nach Stimulierung, welche vier Stunden nach Transfektion mit den Plasmiden erfolgte, analysiert.

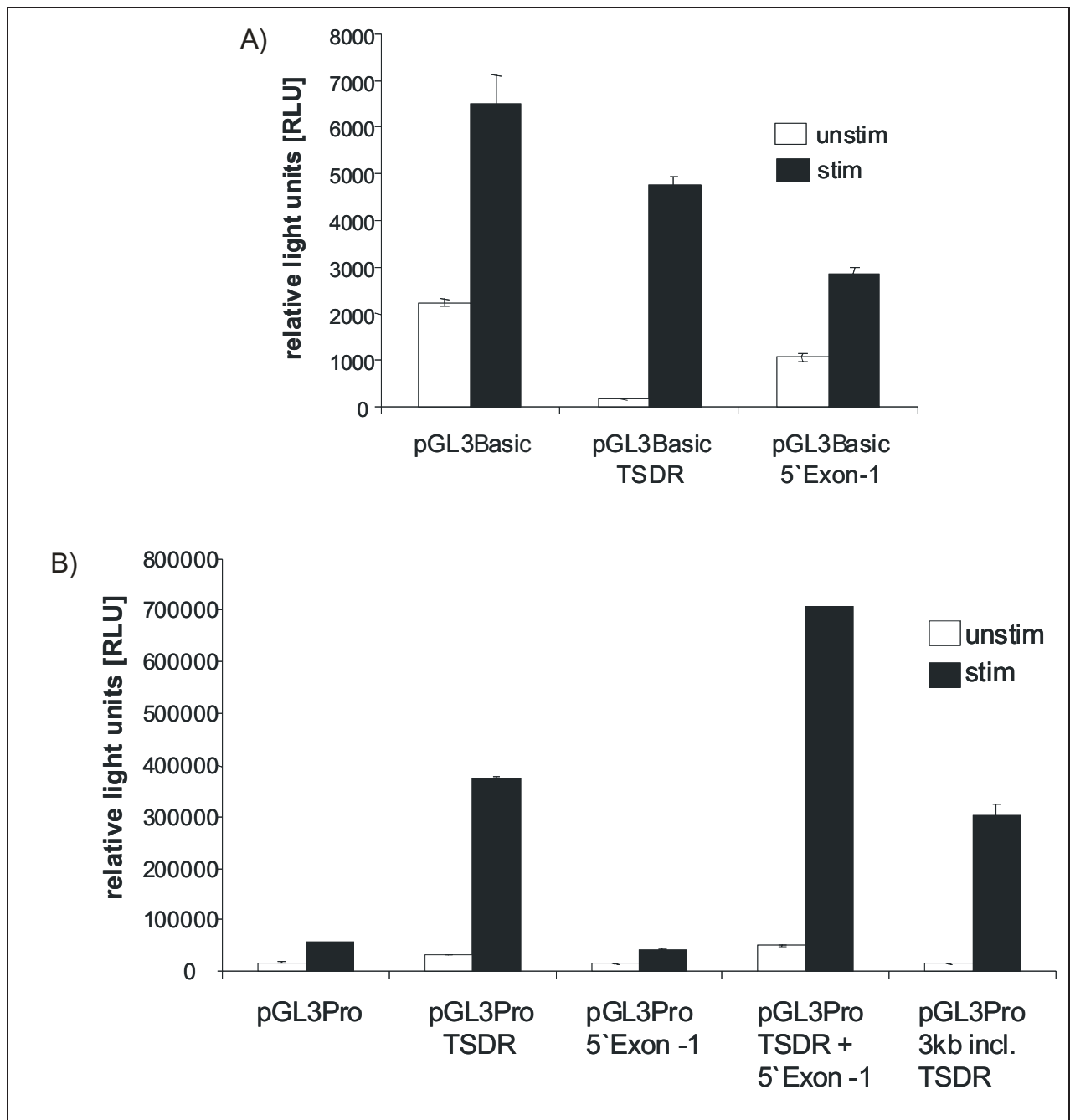


Abbildung 26: **Vergleich der unterschiedlichen Konstrukte in verschiedenen Luciferaseplasmiden**

Für den Luciferaseassay wurden RLM-11 Zellen mit 4 μ g des Plasmides und 0,2 μ g der internen pTKRenilla-Kontrolle nucleofektiert und 24h mit PMA (10ng/ml) stimuliert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und mittels des Dual Luciferaseassays analysiert; Light units wurden auf interne pTKRenilla- Kontrolle standardisiert.

A) Analyse der Konstrukte in dem Plasmid pGL3- Basic; n=3

B) Analyse der Konstrukte in dem Plasmid pGL3- Promoter; n=3

Ein Versuch von drei unabhängigen ist dargestellt.

An Hand der Versuche in Abbildung 4-21 wurde deutlich, dass die Region TSDR keinen eigenständigen Promoter beinhaltet, da in dem Vektor pGL3- Basic keine Luciferase- Aktivität

gemessen werden konnte. Die gemessene Aktivität liegt unter der Hintergrundaktivität des pGL3-Basic (Abbildung 4-21 A). In dem Plasmid pGL3- Promoter sieht man mit dem Konstrukt TSDR eine zehnfache Steigerung der Luciferase- Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle mit dem pGL3- Promoter. Dieser Umstand zeigt, dass die TSDR die Promoterleistung des minimalen SV40 Promoter steigern kann.

Auf Grund dieses Ergebnisses wurden alle weiteren Analysen der TSDR- Konstrukte nur im pGL3- Promoter- Plasmid durchgeführt. Der Vergleich aller drei Konstrukte der Region um die TSDR ergab, dass das Element downstream der TSDR bis zum Exon -1 (5'Exon-1) keine transkriptionale Aktivität zeigt. Das große Element (3kb incl. TSDR) führt zu einer Reduzierung der Luciferase- Aktivität im Vergleich zu dem Plasmid pGL3- Promoter- TSDR. Die Verbindung der Konstrukte TSDR und 5'Exon-1 führt zu einer Steigerung der Luciferase Aktivität um das 1,5 fache im Vergleich zu der Aktivität der TSDR alleine.

4.3.3.2 Methylierung der TSDR im dualen Luciferase- Test

Die Methylierung von DNS kann, wie in der Einleitung beschrieben, eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription spielen. Zwischen CD25⁺ und CD25⁻ T- Zellen und bei den induzierten Tregs wurde im Bereich der TSDR ein differentielles Methylierungsmuster gefunden. In diesem Abschnitt wurde überprüft, ob eine Methylierung der TSDR in den Luciferasekonstrukten in dem Plasmid pGL3- Promoter zu einer Reduzierung der transkriptionalen Aktivität führt.

Für die Analyse der methylierten TSDR wurde ein Vorversuch gemacht. Es wurde die DNS- Menge titriert, die man für einen Luciferase- Test benötigt, da die DNS- Menge durch die Methode der *in vitro* Methylierung sehr eingeschränkt werden kann. Es war zu erkennen, dass 2µg die ideale DNS- Menge für einen Luciferase- Test ist, aber auch mit geringeren Mengen von 1µg und 0,5µg DNS eine deutliche Luciferase Aktivität messbar ist (vgl. Abbildung 4-22 A).

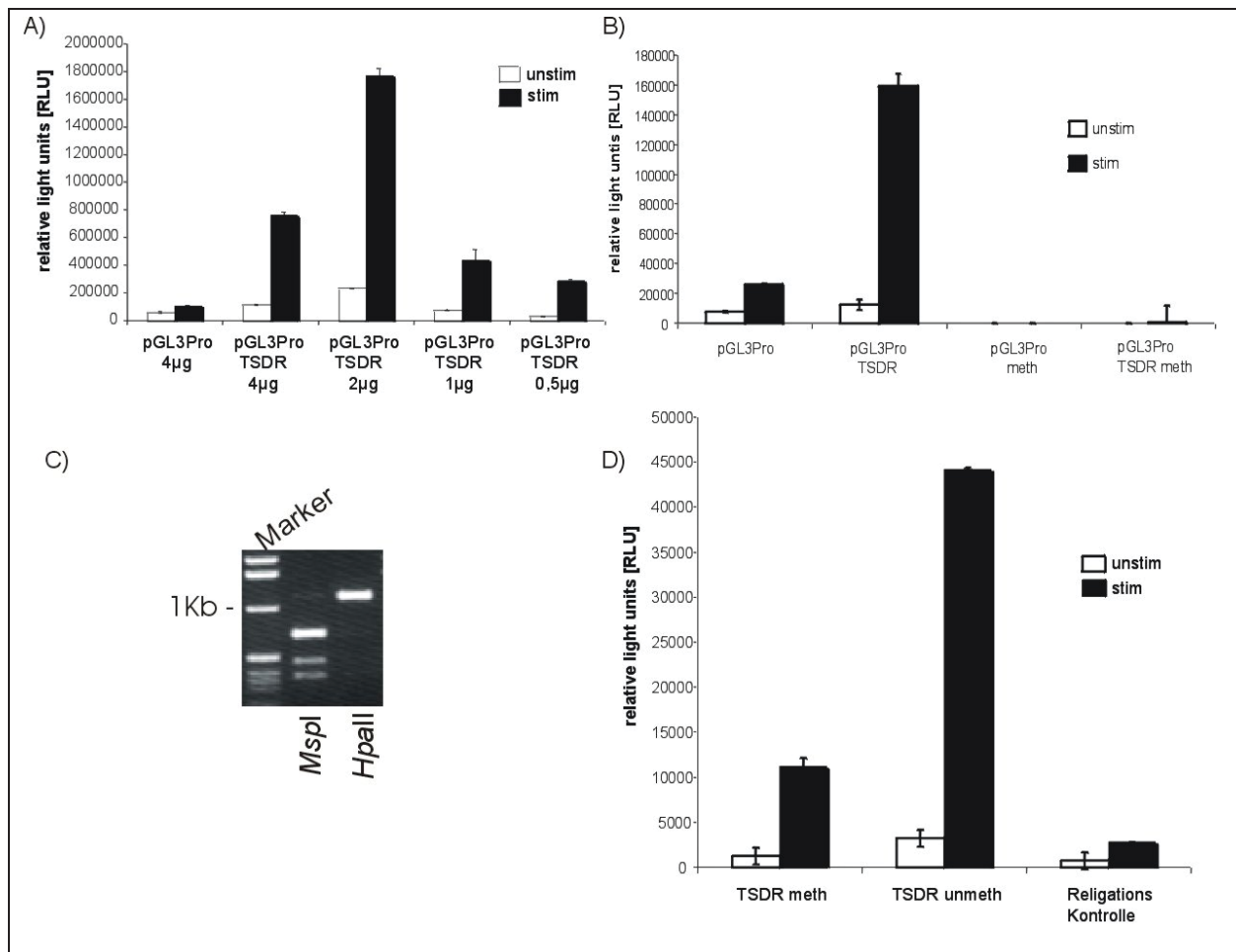


Abbildung 27: **Methylierung der TSDR im Luciferase- Test**

A) Es wurden DNS- Mengen von 4, 2, 1 und 0.5µg DNS getestet; n=3; einer von drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

B) Analyse der Methylierung der TSDR nach der *SssI* Behandlung vor der Ligation mit den Plasmid pGL3-Promoter; beide Restriktionsendonukleasen schneiden CpG- Motive, *MspI* methylierungsunabhängig und *HpaII* methylierungsabhängig.

C) Methylierung des Plasmids erfolgte mit Hilfe des Enzyms *SssI*, Vergleich der Luciferase Aktivität von unmethylierten und mit *SssI* behandelten Plasmiden; n=3; einer von drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

D) Luciferase- Test mit methylierter und unmethylierter TSDR; Religations- Kontrolle bedeutet geöffneter pGL3Promoter und wieder religiert; n=3; ein Versuch von drei unabhängigen ist dargestellt.

Light units wurden auf die interne pTKRenilla- Kontrolle standardisiert.

Eine gesamte Methylierung des pGL3- Promoter mittels der Methylase *SssI* führt zu einem kompletten Verlust der Luciferase Aktivität unabhängig von einklonierten Fragmenten (vgl. Abbildung 4-22 C). Die Methylierung blockiert die gesamte Transkription in dem Vektor, da auch der SV 40- Promoter und das Luciferase- Gen methyliert werden. Auf Grund dieser Ergebnisse in Abbildung 4-22 C musste das Konstrukt TSDR ohne den Vektor pGL3- Promoter methyliert werden. Dieses erreicht man durch

die in Kapitel 3.8.6 beschriebene *in vitro* Methylierung der TSDR, welche aus dem pGL3- Promotor heraus geschnitten wurde und nach erfolgreicher Methylierung wieder mit dem pGL3- Promotor ligiert wurde. Die Methylierung der TSDR wurde durch einen Verdau mit den methylierungsab- bzw. unabhängigen Restriktionsendonukleasen *HpaII* und *MspI* überprüft. Mit der Endonuklease *MspI* war die Restriktion erfolgreich und wie erwünscht wurde mit der Endonuklease *HpaII* keine Restriktion der methylierten TSDR sichtbar (vgl. Abbildung 4-22 B). Im Luciferase- Test mit der un- und methylierten TSDR und dem religierten pGL3- Promoter- Plasmid als Kontrolle zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Luciferase- Aktivität mit der methylierten TSDR im Vergleich zu der unmethylierten TSDR (vgl. Abbildung 4-22 D; ~75%). An Hand dieses Ergebnis kann man erkennen, dass die TSDR nur im unmethylierten Zustand ihre Enhancer- Aktivität entfalten kann.

4.3.3.3 Deletion der TSDR- Region

Für weitere Einblicke in die transkriptionelle Aktivität der TSDR wurden Deletionsmutanten dieser Region hergestellt und in den Plasmid pGL3- Promoter eingebaut. Die Deletionen wurden am 5' Bereich der TSDR begonnen und die 1215bp große TSDR um jeweils ein 303pb, 370bp und ein 275bp Fragment deletiert. Die letzte Deletion führte dazu, dass nur noch ein 267bp großes Fragment des 3' Bereiches der TSDR übrig geblieben ist (vgl. Abbildung 4-23 oben).

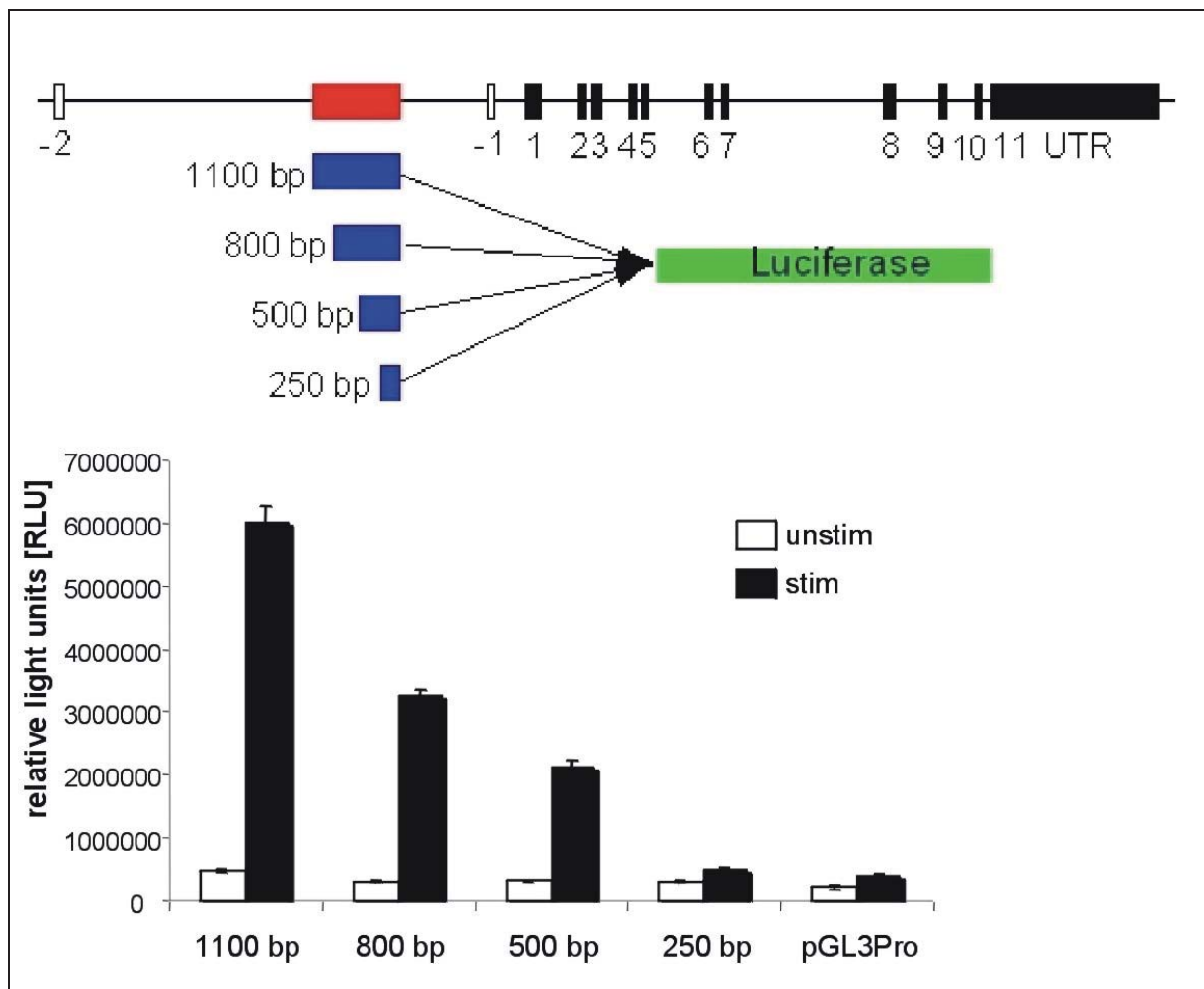


Abbildung 28: **Deletion der TSDR im Luciferase- Test**

Oben: Darstellung der erzeugten Deletionsmutanten der TSDR

Unten: Luciferase- Test mit den Deletionsmutanten der TSDR in RLM-11; „light units“ wurden auf die interne pTKRenilla- Kontrolle standardisiert; n=3; ein Versuch von drei unabhängigen.

Die einzelnen Deletionsschritte führten zu einer graduellen Reduzierung der transkriptionalen Aktivität der TSDR (vgl. Abbildung 4-23). Jedes Deletionsfragment enthält anscheinend Elemente die für die transkriptionelle Aktivität benötigt werden. Das Fragment der Deletion von 500bp zu 250bp ist für die transkriptionale Aktivität der TSDR von größter Bedeutung. Bei dieser Deletion fällt die Luciferase Aktivität auf das Niveau des pGL3- Promoter herab, die anderen Deletionen zeigen nicht diese starke Reduzierung der Luciferase- Aktivität. Man kann davon ausgehen, dass das verbliebene 267bp große Fragment der TSDR keine eigene Aktivität mehr hat. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein genauerer Blick auf die in diesem Bereich der TSDR liegenden Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen, die in dem letzten Deletionsschritt wegfallen. Sie könnten eine große Rolle in der transkriptionalen Aktivität der TSDR und der gesamten Transkription des Foxp3-

Gens spielen. In dieser Region liegen als markante mögliche Bindungsstellen, die von STAT1, CREB/ATF, NF- κ B, c-Ets-1, Foxp3 selbst, NFAT und Evi1 (vgl. Abbildung 4-17).

4.3.3.4 Amaxa- Transfektion von naiven Zellen

Die Verwendung von naiven Zellen bietet die Möglichkeit den Einfluss der Foxp3- Expression bzw. die Regulation der Luciferase- Aktivität in naiven T- Zellen zu analysieren. Für die Versuche mit naiven T- Zellen fiel die Wahl auf die Nucleofektion mit dem Gerät von Amaxa, genau wie bei den Zelllinien. Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz der naiven T- Zellen wurden die ersten Transfektionen mit einem GFP Reporterplasmid durchgeführt, da die Expression dieses Markers sehr schnell nach Transfektion messbar und die Messung der GFP- Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse sehr einfach ist. Dargestellt ist in Abbildung 4- 24 die Transfektionsrate des GFP- Reporterplasmides über einen Zeitraum von 22 Stunden und die Analyse der Überlebensrate der naiven Zellen nach erfolgreicher Transfektion.

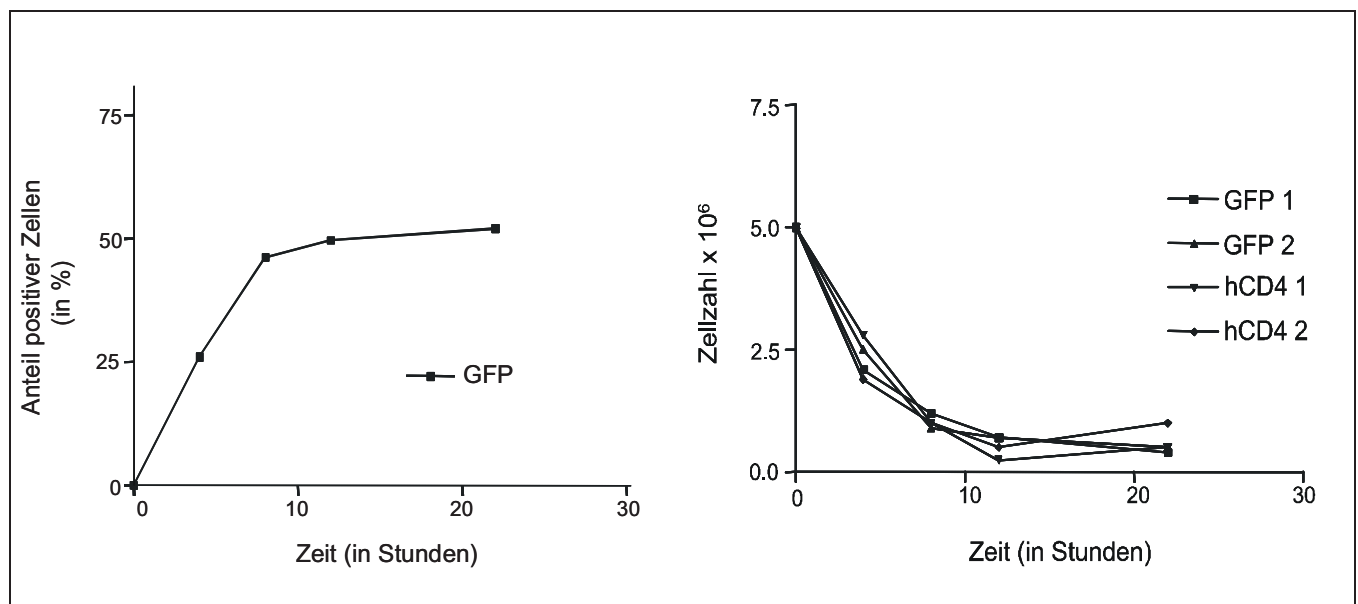


Abbildung 29: Expression des GFP- Reporterplasmids in naiven CD4⁺ T- Zellen und Analyse der Zellzahl nach Amaxa Transfektion

Links: CD4⁺CD25⁻CD62L^{high} T- Zellen wurden isoliert und mittels des Nucleofektors von Amaxa transfiziert; eingesetzter Reporterplasmid: pMCVGFP; die Expression des Reporters wurde 4, 8, 12 und 22 Stunden nach Transfektion gemessen; dargestellt wurde der Anteil der GFP positiven T- Zellen in Bezug auf die absolute Anzahl lebender Zellen.

Rechts: Bestimmung der Anzahl lebender Zellen nach Transfektion mit pMCVGFP und pMCVhCD4; die Zellen wurden mit Trypanblau zu dem Zeitpunkt der Transfektion und 4, 8, 12 und 22 Stunden nach Transfektion gefärbt und die absolute Anzahl lebender Zellen mikroskopisch mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Die Effizienz der Transfektion mittels der Amaxatechnik ist bei dem GFP- Repoterplasmid mit 50% positiver Zellen nach acht Stunden sehr gut. Bei den in Abbildung 4-25 dargestellten Transfektion wurde neben der Transfektionseffizienz ebenfalls die Überlebensrate der Zellen untersucht, da es durch die Nucleofektion bzw. Elektroporation zu einem Absterben der Zellen kommen kann. Hierfür wurde zum Zeitpunkt der Transfektion und allen weiteren Zeitpunkten der durchflusszytometrischen Analyse, die absolute Anzahl lebender Zellen bestimmt. Im rechten Teil der Abbildung 4-25 wird deutlich, dass durch die Elektroporation die meisten Zellen absterben (Reduzierung der Zellzahl um 70-80%). Die Anzahl der überlebenden Zellen ist nach der Elektroporation zu gering um diese Transfektionstechnik bei naiven Zellen vorzunehmen. Das Plasmid pMCVhCD4 wurde transfiziert, um auszuschließen, dass das GFP- Protein einen Einfluss auf die Überlebensrate der naiven T- Zellen hat. Die Transfektion von pMCVhCD4 zeigt den gleichen Einfluss auf die Überlebensrate wie die Transfektion des pMCVGFP- Plasmids. Die Überlebensrate scheint nicht abhängig vom Reportermolekül, sondern der Methode zu sein.

Die Untersuchung der Luciferasekonstrukte mit der TSDR (vgl. Abbildung 4-18) wurde auf Grund der erhaltenen Ergebnisse mit den naiven Zellen (vgl. Abbildung 4-24) nur in Zelllinien durchgeführt. Auf Grund dieser Tatsache war es nicht möglich, die Analyse der Luciferasekonstrukte unter den Bedingungen durchzuführen, unter denen auch die Induktion der Foxp3- Expression in An- und Abwesenheit von TGF- β gesehen worden war (vgl. Abbildung 4-13).

5 Diskussion

5.1 Erzeugung einer Foxp3- transgenen Reportermaus

In dieser Arbeit sollte für die *in vivo* Analyse des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 eine BAC-transgene Maus hergestellt werden, welche eYFP unter der Kontrolle des Foxp3- Promoters exprimiert.

Die Herstellung des Zielgenvektors war erfolgreich. Die Analyse mittels Restriktion zeigte die erwarteten DNS- Fragmentgrößen. Die kodierende Region des eYFPs und die duale frt- Neomycin/Kanamycin- frt- Kasette sind in der richtigen Orientierung integriert worden. Die Sequenzierungen der einzelnen Zwischenprodukte, wie die homologen Regionen oder die kodierende Region des eYFPs, und die abschließende Sequenzierung des Zielgenvektors zeigte keinerlei Abweichungen zu den bekannten Sequenzen der Datenbanken.

Die homologe Rekombination des Zielgenvektors mit dem Foxp3 beinhaltenden BAC ist in dieser Arbeit nicht geglückt. Die ersten Schritte der Methode ET- Klonierung [114] waren erfolgreich. Die homologe Rekombination hat, da die Sequenzen des eYFP und der dualen Kasette nicht an der korrekten Stelle im *foxp3*- Locus integriert haben, nicht funktioniert.

Das Ereignis einer homologen Rekombination unter normalen Bedingungen z.B. mit dem Zielgenvektor in embryonalen Stammzellen ist im Vergleich zu einer nicht homologen Rekombination eher selten. Bei Transfektionen und anschließender homologer Rekombination liegen nur in 4-10% der embryonalen Stammzellen eine homologe Rekombination vor [115]. Bei der Methode des ET- Klonierens wird das Ereignis einer homologen Rekombination durch die Anwesenheit der Rekombinasen E und T in seiner Häufigkeit gesteigert [113]. Auffällig war in unseren Fall, dass es immer zu einer Rekombination, aber nie zu einer homologen Rekombination gekommen ist. Dieser Umstand zeugt von einer sehr schlechten Effizienz der homologen Rekombination in den EL250 Bakterien, welches nicht mit den publizierten Daten übereinstimmt [137]; [138]. Dieses könnte daran liegen, dass zum einem die gewählten homologen Regionen mit 250-300 bp zu klein waren um die homologe Rekombination erfolgreich durchzuführen oder die beiden Rekombinasen E und T nicht aktiv waren und es nur zu einer in Bakterien üblichen nicht homologen Rekombination gekommen ist. Nach den Informationen von Kooperationspartnern des MDCs und vor allem nach Gierl *et al.* (137) sind die kleinen homologen Bereiche erfolgreich beim ET- Klonieren. Andere publizierte Daten sprechen aber von mindestens 1000bp großen, homologen Regionen für eine erfolgreiche homologe Rekombination [112]. Die Aktivierung der beiden Rekombinasen, welche unter einen Hitze-induzierbaren Promoter in den EL250 Bakterien integriert worden sind, erfolgt durch einen 15-

minütigen Schritt (vgl.3.10.2). Dieser Schritt könnte in der Herstellung der elektrokompetenten Bakterien nicht funktioniert haben und folglich konnten die beiden Rekombinasen keine homologe Rekombination vermitteln.

Für die Analyse der Rekombination wurde in dieser Arbeit die Methode der Southern Blot- Analyse gewählt. Eine Überprüfung mittels PCR wäre auch möglich gewesen, hat jedoch gegenüber der Southern Blot- Analyse den wesentlichen Nachteil, dass es immer wieder zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen kommen kann [139] . Die Überprüfung des rekombinierten BACs mit den 5' und 3' externen bzw. internen Sonden zeigte die fehlerhafte Rekombination.

Die interne Sonde konnte das Insert des Zielgenvektors detektieren. Die zweite in unseren Experimenten auftretende Bande von ähnlicher Größe könnte auf eine unspezifische Bindung der Sonde zurückzuführen sein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass es an einer unbekannten Stelle im BAC zu einer Mehrfachintegration gekommen ist, die dieses kleinere Fragment verursacht. Die Mehrfachintegration kann zusätzlich durch einen Vergleich der Intensität der Banden aller positiv getesteten Klonen mit der internen Sonde überprüft werden. In dieser Arbeit spricht die gleich starke Intensität der Banden in allen getesteten Klonen gegen eine Mehrfachintegration des Inserts.

Die beiden externen Sonden binden an der Stelle im BAC, an der die homologe Rekombination stattfinden sollte. Daher kann mit den externen Sonden der unveränderte WT- Locus detektiert werden. Im Gegensatz zur internen Sonde, welche eine Mehrfachintegration oder ein Vorhandensein von Mischklonen (Integration an mehreren Stellen im BAC) überprüft, dienen die externen Sonden der Überprüfung der korrekten Position des Inserts in dem BAC. Die korrekte Position wird durch die Bindung der Sonden außerhalb der integrierten Bereiche und die durch die Integration entstehende veränderte Größe der Banden bestimmt (vgl. Abbildung 4-5). Bei den in dieser Arbeit überprüften BACs lag die korrekte Position nicht vor. Die Sequenzierung bestätigte das Ergebnis der Southern Blot- Analyse. Die Primer der Sequenzierung, welche außerhalb des Inserts lagen, konnten keine homologe Rekombination, sondern nur die WT- Sequenz detektieren. Die Primer im Insert zeigten, wie in Abbildung 4-7 dargestellt, eine Rekombination im unbekannten Bereich des BACs. Des weiteren konnte ich feststellen, dass im 5' Bereich des Inserts unbekannte DNS eingebaut worden ist, die nicht im BAC und auch nicht im Zielgenvektor vorhanden ist. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich dabei um DNS der Bakterien EL250 handelt, welches nicht überprüft werden konnte, da sie Sequenzabfolge des Genoms dieses *E. coli*- Stamms nicht bekannt ist. Weitere Analysen der Klone wurden nicht gemacht, da nach den Sequenzierungsergebnissen die Kooperation mit der Münchener Gruppe und die Arbeit mit der DEREK- Maus gestartet wurde.

5.2 Analyse der DEREK- Maus – funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3

Die DEREK- Maus ist für die Untersuchung der Regulation und funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 von entscheidender Bedeutung. Im Vorfeld der Arbeit war über die Regulation und die funktionelle Rolle von Foxp3 nicht viel bekannt. Im Laufe dieser Arbeit wurden unterschiedliche Foxp3- Reportermäuse generiert [38] ; [36] ; [33] ; (36); [140] .

In dieser Arbeit wurden erste initialen Versuche mit der DEREK- Maus gemacht. Bei der Verteilung von Lymphozyten in der DEREK- Maus sieht man keine Unterschiede im Vergleich zu WT- Tieren. Auch die Frequenz von T- Zellen (CD4 und CD8), sowie der Anteil an Foxp3⁺ T- Zellen sind identisch [37] . Die Anzahl der Foxp3⁺ T- Zellen stimmt mit der Anzahl der GFP⁺ T- Zellen überein, alle Foxp3⁺ T- Zellen sind ebenfalls GFP⁺ T-Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass es keine GFP⁺ T- Zellen gibt, die kein Foxp3 exprimieren. Dieser Umstand spricht für eine identische Regulation des GFPs auf dem BAC und des endogenen Foxp3. Die Expression des GFPs im Vergleich zu dem endogenen Foxp3 spricht ebenfalls dafür, dass keine up- oder downstream liegenden Regulationselemente im Bereich des integrierten BACs einen Einfluss auf die Regulation des GFPs haben. Man kann davon ausgehen, dass das gleiche Expressionsmuster auch für den Diphtheria- Toxin- Rezeptor vorliegt, da es sich um ein DTR- GFP Fusionsprotein handelt. Außerdem wurde scheinbar durch die ungesteuerte Integration kein wichtiger Locus im murinen Genom zerstört, da die Maus keinerlei augenscheinlichen Phänotyp im Vergleich zu WT- Mäusen aufweist [37] .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen durch DT- Injektion in allen wichtigen Organen überprüft. Es wurden Analysen wie in 4.1.5 beschrieben in mLK, pLK, PP, Thymus, IEL und Milz durchgeführt. In allen Organen zeigte sich das gleiche Bild nach Zugabe von Diphtheria- Toxin. Alle GFP⁺ T- Zellen wurden durch die Verabreichung von Diphtheria- Toxin eliminiert. Durch den oben schon beschriebenen Umstand, dass alle Foxp3⁺ T- Zellen GFP⁺ sind, sollten natürlich auch alle Foxp3⁺ T- Zellen ebenfalls depletiert werden. Die Depletion der GFP⁺ T- Zellen war nach zwei Tagen vollständig. Lediglich ein geringer Anteil von Foxp3⁺ T- Zellen war zu diesem Zeitpunkt noch zu sehen. Der Anteil liegt immer bei ~ 0,2 % der CD4⁺ T- Zellen (vgl. Abbildung 4-10). Dieser Anteil von Foxp3⁺ T- Zellen könnte durch einen Färbeartefakt entstanden sein. Die DEREK- Maus zeigte somit den gewünschten Phänotyp und ist für weitere Untersuchungen der Regulation und vor allem für die funktionelle Analyse der Rolle von Foxp3 ein bedeutendes Werkzeug.

Der geringe Anteil an verbleibenden Foxp3⁺ T- Zellen könnte, neben der Erscheinung als Färbeartefakt auch auf die unterschiedliche Regulierung von Foxp3 und GFP auf post- transkriptioneller Ebene zurückzuführen sein. Jedoch ist über die post- transkriptionelle Regulation von Foxp3 nicht viel bekannt. Es gibt lediglich einige Hinweise auf die Rolle von microRNAs an der Regulation [84] und Unterschiede in der Expression von Foxp3- mRNA und dem Protein [32] . Man konnte in Zellen große Mengen von Foxp3- mRNA finden, aber kein Foxp3- Protein. Nach Aktivierung wurde die Menge von

Foxp3- Protein gesteigert, aber die der mRNA herunterreguliert. Bei der post- transkriptionellen Regulation des GFP- Gens könnte es sein, dass die Menge der GFP- mRNA mit der des Proteins übereinstimmt. Dieser Unterschied könnte dazu führen, dass es einen geringen Anteil von Foxp3⁺ T-Zellen gibt, welche erst nach der erfolgreichen Depletion der GFP⁺ T-Zellen sichtbar werden.

Der Untersuchung der beiden Diphtheria- Toxine von unterschiedlichen Herstellern lagen die gegensätzlichen Ergebnisse von Lahl *et al.* 2007 [37] und Kim *et al.* 2007 [36] zu Grunde. In Lahl *et al.* (36) wurde beschrieben, dass der „scurfy“ Phänotyp mit einem Sterben der Mäuse nur bei Gabe des DTs neonatal ausgelöst werden kann. Kim *et al.* (35) beschreiben diesen Phänotyp auch für sechs bis acht Wochen alte Tiere. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich die Toxizität der beiden Toxine erheblich unterscheidet. Das Toxin der Firma Merck, welches von Lahl *et al.* (36) und auch in dieser Arbeit für vorangegangene Depletionen verwendet worden ist, hat eine deutlich geringere Toxizität als das Produkt von Sigma. Mit dem Toxin von Sigma zeigten die DEREK- Mäuse und die WT- Tiere den gleichen Gewichtsverlust. Dieser Umstand ist nicht auf das Fehlen der Tregs in den DEREK- Tieren durch die Depletion der Foxp3⁺ T- Zellen zurückzuführen, da DT in den WT- Tieren keinen Einfluss auf die Foxp3⁺ T- Zellen hat. Das Toxin von Sigma hat demnach eine grundlegende Toxizität auf die Mäuse, die ab einer bestimmten Dosis in den Tieren zu wirken beginnt, da die Tiere alle zwei Tage 1 µg Diphtheria Toxin bekamen und der Gewichtsverlust erst bei der sechsten Injektion auftrat und bei der fünften Injektion noch nicht erkennbar war. Die Tiere, welche mit dem Toxin von Merck behandelt worden waren, zeigten den Gewichtsverlust nicht. Es gibt zwei mögliche Erklärungen für diesen Unterschied, zum einen kann es bei der Produktion des Toxins von Sigma zu einer Verunreinigung gekommen sein und zum anderen kann die Angabe 1 µg zwar für beide Toxine gleich gewesen sein, aber die biologische Aktivität des Toxins, die in einem 1 µg enthalten ist, kann unterschiedlich sein. Die Verunreinigung, wie auch die höhere biologische Aktivität kann zu dem drastischen Verlust des Gewichtes geführt haben.

Der histologische Phänotyp nach der Behandlung mit den beiden Toxinen zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Toxinen, sondern nur den erwarteten Unterschied zwischen den DEREK- Mäusen und den WT- Tieren. Die DEREK- Mäuse zeigten die erwartete Depletion der GFP/Foxp3⁺ T- Zellen, während die WT- Tiere noch normale Zahlen an Foxp3⁺ T- Zellen hatten. Die DEREK- Mäuse zeigten auch in diesem Versuch, dass die Expression von GFP und des Diphtheria Toxin Rezeptors erfolgreich ist und man auf diesem Weg die Foxp3⁺ T- Zellen zum einen fluoreszent markieren und zum anderen mittels Toxingabe depletieren kann.

5.3 Expression und funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors Foxp3

In der funktionellen Analyse konnte festgestellt werden, dass Foxp3 in den *ex vivo*- isolierten Tregs eine stabile Expression aufweist, während bei den induzierten T- Zellen ein instabiler Phänotyp zu beobachten war. Über die molekularen Signale, die zur Induktion von Foxp3 führen, ist noch nicht viel bekannt. Es wurde beschrieben, dass ein TZR- Stimulus notwendig ist [55] ; [141] ; [142] . Weitere Arbeiten beschreiben eine essentielle Rolle von TGF- β [143] ; [66] ; [28] ; [144] ; [65] . Durch die Zugabe von Retinolsäure (RA) zu den Induktionskulturen konnte die Induktionseffizienz noch gesteigert werden [72] ; [73] ; [74] . Auch dem Hormon Estrogen wird eine Rolle in der Regulation bzw. Induktion von Foxp3 zu geschrieben [145] ; [57] . Bei der Induktion der Foxp3- Expression durch TGF- β ist die Anwesenheit von IL-2 essentiell [59] ; [146] .

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass für eine stabile Expression von Foxp3 in suppressorischen Zellen der Methylierungsstatus eine Rolle spielt. In Floess*, Freyer* *et al.* [1] konnten wir zeigen, dass die als TSDR (Treg specific demethylated Region) bezeichnete Region im Intron1 des Foxp3- Gens bei stabilen *ex vivo* isolierten CD25⁺Foxp3⁺ T- Zellen demethyliert vorliegt, während sie bei CD25⁻Foxp3⁻ T- Zellen methyliert ist. Dieser gefundene Methylierungsstatus bedeutet, dass die auf ihre Stabilität *in vivo* getesteten T- Zellen, bei denen es sich ebenfalls um *ex vivo* isolierte T- Zellen handelte, auch eine demethylierte TSDR haben (vgl. Abschnitt 4.2.1). Die CD25⁻ T- Zellen, welche nach TGF- β - Gabe Foxp3 zu einem hohen Prozentsatz exprimierten, zeigten diese vollständige Demethylierung nicht (vgl. Abbildung 4-14). Es war sogar so, dass die induzierten Tregs in Abwesenheit von TGF- β nach Restimulation die Foxp3- Expression wieder herunter regulieren und gleichzeitig der Methylierungsgrad wieder auf 100% anstieg. Die induzierten Zellen zeigten keinen stabilen Phänotyp und keine vollständige Demethylierung. Die *ex vivo* isolierten Tregs zeigten dagegen stabile Foxp3- Expression und eine komplette Demethylierung der TSDR (vgl. Abschnitt 1.4.1). Dieser Umstand lässt die Schlussfolgerung zu, dass es eine Korrelation zwischen Methylierung und stabiler Foxp3- Expression gibt.

Es wurde weiterhin die Bedeutung der Foxp3- Expression für die suppressorische Aktivität der Tregs in einem *in vitro* Proliferations- Test untersucht. Eine Rolle von Foxp3 für die Funktion von Tregs wurde schon oft veröffentlicht [147] ; [32] ; [23] , aber hier konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen der suppressorischen Eigenschaft, der Stabilität und der Demethylierung der TSDR gibt. Die Zellen mit dem höchsten Anteil von demethylierten CpGs in der TSDR haben auch die stabilste Foxp3- Expression und zeigen die effektivste suppressive Kapazität. Der exakte Suppressions- Mechanismus konnte bisher jedoch nicht geklärt werden [44] ; [148] . Foxp3 ist das entscheidende Molekül in Zellen, wenn sie regulatorische Eigenschaften zeigen sollen. Dieses ist vor allem bei den „wannabe“- Tregs beschrieben worden (32); (33). Diese Tregs werden im Thymus generiert und unterlaufen erst einmal die normale Treg- Entwicklung, aber durch die fehlende Foxp3-

Expression (vgl. 1.2) besitzen sie keine suppressorischen Eigenschaften, sondern gleichen in der Peripherie eher Th1 oder Th2 Zellen [33] ; [34] . Weiterhin konnte in der Arbeit von Williams und Rudensky (32) gezeigt werden, dass eine permanente Expression des Foxp3- Moleküls von großer Bedeutung für die Funktion von Tregs ist. Dieser Umstand konnte auch bei dem Vergleich der *ex vivo* Tregs mit den induzierten Tregs beobachtet werden. Durch die Restimulation in Abwesenheit von TGF- β nach erfolgreicher Induktion der Foxp3- Expression verloren die induzierten Tregs nicht nur ihre Foxp3- Expression, sondern auch ihre suppressorische Kapazität. Die permanente, stabile Foxp3- Expression scheint über den Methylierungsstatus der TSDR gesteuert. Liegt die TSDR demethyliert vor, kommt es zu einer stabilen, permanenten Expression (*ex vivo* Tregs), liegt sie methyliert oder nur schwach demethyliert vor ist die Expression nicht stabil (induzierte Tregs).

5.4 Regulation der Transkription des Foxp3- Gens

Über die Regulation von Foxp3 auf molekularer Ebene ist ein bisher wenig bekannt. Nur einige, wenige Arbeiten brachten in den letzten Jahren erste Hinweise in die Regulation von Foxp3, wie in der Einleitung beschrieben worden ist. Im humanen *Foxp3*- Locus wurden im letzten Jahr der „core“- Promoter gefunden [52] und ein weiterer konservierter Bereich mit STAT 5 Bindestellen [58] im Intron1.

In dieser Arbeit wurde auf die Regulation der Transkription des Foxp3- Gens im murinen Locus fokussiert. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Aufbau des murinen Locus, damit durch die vorgefundenen Strukturen Rückschlüsse auf die möglichen Regulationsmechanismen gezogen werden konnten.

5.4.1 Aufbau des *foxp3*- Locus

Durch den Vergleich der Sequenzen des Foxp3- Gens unterschiedlicher Spezies konnten erste Strukturen neben der schon bekannten Exon und Intron Struktur gefunden werden [131] . Auffällig waren drei homologen Bereiche im Promoter und im Intron 1, die es in Maus, Mensch, Ratte, Hund und Schimpanse gibt (71). Hier wurde erkennbar, dass nicht nur die Exon Struktur, und vor allem die Namensgebende und Familienzugehörigkeit bestimmende „Forkhead“ Domäne [131] ; [149] stark zwischen den Spezies konserviert ist, sondern dies auch auf andere Bereiche zutrifft, die demnach eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielen können. Die ersten Analysen der gefundenen konservierten Region zeigten auf, dass man die Daten von Mantel *et al.* [52] , und Zorn *et al.* [58] , für den humanen Locus mit den nun gefundenen, murinen, konservierten Regionen verknüpfen kann. Der von Mantel *et al.* beschriebene „core“- Promoter für das humane Foxp3 liegt im ersten konservierten

Bereich und lässt den Schluss zu, dass der „core“- Promoter des murinen Foxp3 ebenfalls an dieser Stelle zu finden ist. Diese Tatsache wird noch deutlicher, da in diesem homologen Bereich der Erste der zwei postulierten Transkriptionsstarts im murinen Lokus zu finden ist (nicht gezeigte Datenbank-Analyse; ensembl und genomatix). Der zweite postulierte Transkriptionsstart liegt downstream der dritten Homologie in der die in dieser Arbeit behandelte TSDR liegt und unmittelbar vor dem Translationsstart des murinen Foxp3- Proteins (ebenfalls Datenbankanalyse und Brunkow *et al.* 2001 [131]). In der homologen Region der TSDR liegt auch der von Zorn *et al.* [58] , beschriebene Bereich im humanen Lokus mit den postulierten STAT 5 Bindestellen. Die beiden konservierten Bereiche könnten somit entscheidende Rollen in der Regulation der Transkription des Foxp3- Gens spielen. Die zweite homologe Region enthielt nur repetitive Elemente, genauer gesagt SINES (short interspersed sequences), die im gesamten Vertebraten Genom vorkommen und selten eine Bedeutung für die Regulation von Genen spielen [150] . Trotzdem wurde kürzlich für den murinen *foxp3*- Lokus in diesem Bereich ein TGF- β responsives- Enhancer- Element gefunden werden (71). Die Bindung von SMAD und TZR- vermittelten Transkriptionsfaktoren an dieses Element führt zur Öffnung des Foxp3- „core“- Promotors. Er wird demethyliert und es kommt zu Histon- Modifikationen in diesem Bereich. An der TSDR wurden keine Analysen durchgeführt, trotzdem unterlegen diese Daten unsere gefundene Ergebnisse bei der Induzierung von Tregs mittels TGF- β (vgl. Abschnitt 4.2). Es kommt in den induzierten Tregs zu einer initialen Foxp3- Expression, aber nicht zu einer vollständigen Demethylierung der TSDR, wie es bei den ex vivo Tregs der Fall ist (63), und die Foxp3- Expression ist nicht stabil.

Die in einer in siliko Analyse der TSDR gefundenen möglichen Transkriptionsfaktor- Bindestellen können einen ersten Eindruck über die funktionelle Rolle der TSDR bei der Transkription von Foxp3 geben. Einige von den möglichen Bindestellen sind von besonderem Interesse. Darunter fallen vor allem die schon in T- Zellen und Tregs beschriebenen Faktoren NF- κ B [132] ; [133] , NFAT [134] ; [135] ; [136] , STAT [63] ; [58] , SMAD [70] ; [151] und auch CREB/ATF. Weiterhin könnten Faktoren besonders interessant sein, deren Bindung schon als methylierungsabhängig beschrieben worden ist, wie z.B. CREB/ATF [152] oder im Zusammenhang mit TGF- β und den SMAD- Faktoren, wie z.B. Evi-1 eine Rolle spielen [153] ; [154] . Im Falle des CREB/ATF wurde im Laufe dieser Arbeit eine methylierungsabhängige Bindung an der TSDR von Kim und Leonard, 2007 [155] beschrieben. Weitere Analysen der möglichen Bindungen von Transkriptionsfaktoren müssen überprüft werden, z.B. durch CHIP- Analysen um in dieser Frage Klarheit zu gewinnen. Interessant ist auch die vorgeschlagene Bindestelle für Foxp3 selbst. Diese würde, wenn die Bindung bestätigt werden kann, für einen autokrinen „Feedback Loop“ sprechen, der entweder die Transkription fördern bzw. stabilisieren oder aber auch unterdrücken könnte (32).

Die Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren kann einen weiteren Einblick in die Funktion der TSDR geben und auch weitere Hinweise für die Klärung der unterschiedlichen Methylierungsmuster in *ex vivo* isolierten CD25⁺ zu CD25⁻ T- Zellen und induzierten Tregs liefern. Die Bindung von

Transkriptionsfaktoren kann die Transkription eines Gens stabilisieren [93] und die Methylierung könnte die Bindung von stabilisierenden Faktoren verhindern und somit die stabile Expression in den induzierten Tregs verhindern. Dies würde dafür sprechen, dass die initiale Transkription vom Promoter in der gefundenen ersten homologen Region (Methylierungsstatus in induzierten Tregs und [155]) ohne eine funktionelle bzw. demethylierte TSDR gestartet werden kann und die Stabilität der Expression durch den gleichen Mechanismus wie bei dem IL-2- Locus [101] über die TSDR gesteuert wird. Natürlich kann es noch andere Regulationsmechanismen der Foxp3- Expression geben. In dieser Arbeit wurde z.B. die post- transkriptionale Regulation nicht untersucht, aber auch für diese Art der Regulation gibt es erste Hinweise bei dem murinen *foxp3*- Locus [32] ; [84] . Die vollständige Entschlüsselung der molekularen Regulation der Transkription des murinen Foxp3- Proteins wird noch einiges an interessanten Ansätzen erfordern.

5.4.2 Transkriptionale Aktivität der TSDR

Die in dieser Arbeit durchgeführten Luciferase- Tests geben erste konkrete Hinweise auf die transkriptionelle Rolle der TSDR im murinen *foxp3*- Locus. In den ersten Versuchen konnte geklärt werden, ob es sich bei der TSDR um einen zusätzlichen Promoter im murinen *foxp3*- Locus handelt oder ob die TSDR ein additives Element zur Unterstützung der Aktivität des Promoters ist (z.B. ein Enhancer). Die Theorie eines zweiten eigenständigen Promoter wurde durch den Umstand unterstützt, dass für das murine Foxp3 drei ESTs (Expressed Sequence tags) gefunden worden sind (Datenbank des NCBI und ensemble). Das erste beginnt am beschriebenen Promoter [52] ; [155] , das zweite EST beginnt unmittelbar hinter der TSDR am Exon-1 und das dritte am eigentlichen Transkriptionsstart im Exon1. Das zweite EST lässt die Vermutung zu, dass es sich bei der TSDR um einen zusätzlichen Promoter handeln könnte. Zur Überprüfung beider Möglichkeiten wurden im Luciferase- Test zwei unterschiedliche Vektoren eingesetzt, die eine Unterscheidung zwischen Promoter und additiven Element ermöglichen (vgl. Abschnitt 4.3.4.2). Im pGL3- Basic, der keinen eigenen Promoter enthält konnte keine Aktivität der Luciferase gemessen werden, was bedeutet, dass es sich bei der TSDR nicht um einen eigenständigen Promoter handelt. In einem zweiten Ansatz wurde der pGL3- Promoter, welcher einen minimalen SV40- Promoter beinhaltet, eingesetzt. Die mit dem pGL3- Promoter und der integrierten TSDR gezeigte stärkere Luciferaseaktivität deutet darauf hin, dass es sich bei der TSDR um ein additives Element, wie z.B. ein Enhancer zur Unterstützung des Foxp3- Promoters handelt. Die gleichen Ergebnisse konnten auch unsere Kooperationspartnern Edgar Schmitt (Institut für Immunologie, Universität Mainz) mit dem TSDR- Konstrukt in ex vivo- isolierten Tregs gezeigt werden. Weitere Analysen zeigten auch, dass die TSDR alleine einen zehnfach- verstärkten Effekt auf die Luciferaseaktivität hat, während die anderen untersuchten Konstrukte die Aktivität im

Zusammenspiel mit der TSDR nur 1,5fach steigern konnten oder gar kein Einfluss auf die Expression der Luciferase zeigten.

In weiteren Analysen der TSDR in Luciferase- Tests konnte gezeigt werden, dass es für die transkriptionale Aktivität der TSDR von entscheidender Bedeutung ist, dass die TSDR in einem demethylierten Zustand vorliegt. Eine Methylierung der TSDR verhindert die Aktivität der Luciferase. Dieses Ergebnis zeigt, dass das gefundene Methylierungsmuster in den *ex vivo* isolierten CD25⁺ T-Zellen und in den induzierten Tregs eine Bedeutung für die Foxp3- Expression hat. Eine genauere Überprüfung des Zusammenhanges ist notwendig, da die Luciferase- Tests unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt worden sind. Die Zelllinie zeigt keine endogene Foxp3- Expression und somit ist unklar, ob alle Faktoren, die durch die Aktivierung der Zellen produziert werden, auch bei der Transkription des Foxp3- Gens in Tregs vorhanden sind. Weiterhin ist zu überprüfen, ob die transkriptionelle Aktivität der TSDR nicht nur im Zusammenhang mit dem minimalen Promoters des SV40, sondern auch mit dem endogenen Foxp3 Promoter beobachtbar ist, wie es von Kim und Leonard [155] für ein kleines Fragment der TSDR (299 bp) gezeigt werden konnte. In diesem Zusammenhang könnte, ähnlich zu der Arbeit von Kim und Leonard, überprüft werden, ob die Methylierung bei dem Zusammenspiel der TSDR mit dem endogenen Promoter eine unterstützende oder inhibierende Funktion hat. Diese weiteren Analysen der TSDR erscheinen immer noch als wichtig, obwohl die Arbeit von Kim und Leonard dieses für das 299 bp große Fragment schon gezeigt haben, da unser analysierter Bereich deutlich größer ist (1235 bp) und es so, da weitere regulative Elemente enthalten sein können, zu anderen Ergebnissen kommen kann.

Die Deletionen der TSDR konnten den wichtigsten Bereich in der TSDR näher eingrenzen, welcher 673 bp downstream von dem Start der TSDR beginnt und 267 bp upstream des 3'Endes aufhört. Der in dieser Arbeit gefundene Bereich beinhaltet auch die von Kim und Leonard [155] beschriebene Region und unterstreicht die Bedeutung dieser Region deutlich. Die Ergebnisse beider Arbeiten zeigen, dass dieser Bereich für die transkriptionelle Aktivität von entscheidender Bedeutung ist. Die transkriptionelle Aktivität nimmt mit jedem Deletionsschritt ab. Das letzte verbleibende Stück des 3'Endes der TSDR zeigt nur noch basale Aktivität der Luciferase, die auch der pGL3- Promoter ohne weitere Inserts erreicht wird. Der letzte Deletionsschritt war mit dem größten Verlust an Luciferaseaktivität verbunden Schritt.

5.4.3 Gen- Regulation und Chromatin- Struktur im *foxp3*- Lokus

In der Einleitung wurde der Zusammenhang der Regulation der Transkription eines Genes mit Histon-Modifikationen erläutert. Histon- Modifikationen wurden auch im Bereich der TSDR gefunden. Die Histone H3 und H4 weisen im Bereich der TSDR bei CD25⁺ T- Zellen im Gegensatz zu CD25⁻ T- Zellen eine Acetylierung auf. Ebenfalls konnte eine tri- Methylierung des Lysins4 des Histon3

nachgewiesen werden. Diese Modifikationen sprechen dafür, dass im Bereich der TSDR Euchromatin vorliegt. Dies bedeutet, wie schon in der Einleitung beschrieben, dass an dieser Stelle offene Strukturen vorliegen. Diese offenen Strukturen erleichtern die Expression von den in diesem Bereich liegenden Genen.

Die Modifikationen von Histonen können auch im Zusammenspiel mit der Methylierung von DNS auftreten und sich gegenseitig unterstützen und ergänzen [108] ; (101). Mit den in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnissen, kann man dieses Zusammenspiel auch für den murinen Foxp3 Locus vermuten. In den *ex vivo* isolierten CD25⁺ T- Zellen wurde nicht nur die Demethylierung der TSDR, sondern auch Histon- Modifikationen gefunden. Bei den induzierten Tregs konnte nur eine teilweise Demethylierung der TSDR gefunden werden und das Histon- Modifizierungsmuster sieht auch anders aus als bei *ex vivo* isolierten CD25⁺. Die ersten, vorläufigen Daten zu den Histon- Modifikationen in den induzierten Tregs wurden in unserer Arbeitsgruppe von Julia Polansky erstellt und zeigten für die Acetylierung der Histone H3 und H4 die gleichen Ergebnisse wie die Modifikationen bei den *ex vivo* isolierten CD25⁺ T- Zellen. Die tri- Methylierung des Lysins 4 des Histon3 fiel bei den induzierten Tregs signifikant geringer aus als bei den *ex vivo* isolierten CD25⁺ T- Zellen. Dieser Umstand könnte bedeuten, dass die tri- Methylierung des Lysins 4 erst erfolgt, wenn die TSDR komplett demethyliert ist oder die Demethylierung erst erfolgen kann, wenn die tri- Methylierung erfolgt ist. Die Histon- Modifikationen zeigen einen weiteren Umstand im Zusammenhang mit der Stabilität der Foxp3- Expression und der regulativen Rolle der Transkription durch die TSDR. In Kang *et al.* konnte ebenfalls bei der Induktion der Foxp3- Expression durch Retinolsäure (engl. Retonic Acid, RA) auch eine Acetylierung der Histone im „core“- Promotor nachgewiesen werden.

5.5 Ausblick

Ein erster Einblick in die funktionelle Rolle und die Regulation des murinen Transkriptionsfaktors Foxp3 konnte in dieser Arbeit gewonnen werden.

Die weitere Analyse der DREG- Maus wird noch mehr Informationen über die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 bringen oder besser gesagt über die Zellen, welche Foxp3 exprimieren. Erste Schritte in diese Richtung könnte eine Untersuchung der Depletion im Entzündungsmodell DTH (delayed- type- hypersensitivity) und die Erforschung von Tumorentwicklung in An- und Abwesenheit von funktionellen Tregs sein. Interessant ist auch der Aspekt, wann und ob die Tregs nach erfolgter Depletion wieder entstehen, also wie lange es dauert, bis neue Foxp3⁺ T- Zellen in dem Thymus generiert werden, in dem man z.B. thymektomierten Mäusen Diphtheria- Toxin verabreicht und kontrolliert, ob Foxp3⁺ T- Zellen aus dem Pool der peripheren Zellen entstehen. Weitere Analysen können auch über den Ursprung der Tregs (Thymus oder Peripherie) gemacht werden. Mit der

DEREG- Mäusen werden eine Vielzahl von Versuchen möglich, um die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktor Foxp3 weiter zu analysieren.

Weiterhin wurde im Zuge dieser Arbeit eine Region im Locus des Foxp3- Gens identifiziert, die TSDR, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Foxp3- Expression spielt. Für weitere Analysen der Struktur des *foxp3*- Locus sollte auch ein DNase- Hypersensitivity- Test mehr Information liefern. Dieser Test gibt noch mehr Klarheit, ob der *foxp3*- Locus in CD25⁺ versus CD25⁻ T- Zellen eine offene bzw. geschlossene Struktur aufweist. Diese Daten würden die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und der ChIP- Test ergänzen. In unserer Arbeitsgruppe wird daran gearbeitet, in *in vitro* Kulturen die Stabilität der Foxp3- Expression durch repetitive Stimulation in der Anwesenheit von TGF- β zu verbessern und mehr über das Methylierungsmuster bei einer stabilen, induzierten Foxp3- Expression herauszufinden. Fragestellungen könnten dabei sein: Welchen Einfluss hat die mehrfache Stimulation in Anwesenheit von TGF- β auf das Methylierungsmuster? Wird die TSDR immer stärker demethyliert? Welchen Einfluss hat die Verwendung von Aza- Cytidin- Behandlung auf die induzierten Tregs oder auf die Induktion selbst?

Wie in Abschnitt 5.4.3 schon angedeutet, sind die Ergebnisse zur transkriptionellen Aktivität der TSDR eine erste erfolgreiche Analyse, die aber noch weiter vertieft werden muss. Die Analyse zusammen mit dem endogenen Foxp3- Promoter wird dabei noch einmal genauer zeigen, in welchem Maße die Aktivität durch das gefundene Element TSDR gesteigert werden kann. Auch kann in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Methylierung der TSDR weiter untersucht werden. Von entscheidender Bedeutung wird die Analyse der Bindung der postulierten Transkriptionsfaktoren an die TSDR sein. Sie könnten einen weiteren Einblick in den gesamten Ablauf der Regulation des Transkriptionsfaktor Foxp3 im Zusammenhang mit der Methylierung bzw. Demethylierung und den gefundenen Histon Modifikationen geben. Hierbei wird entscheidend sein, welche Faktoren an der Regulation der Expression des Foxp3- Gens beteiligt sind und ob die Bindung methylierungsabhängig oder -unabhängig erfolgt. In folgenden Versuchen sollte dieser Umstand in den durch die Deletion gefundene Region der TSDR genauer analysiert werden. Hier könnten auch mit hoher Wahrscheinlichkeit die wichtigsten Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen gefunden werden. Nächste Schritte könnten z.B. die Deletion einzelner Bindungsstellen sein, um den Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität zu beobachten. Mögliche Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen in diesem Bereich sind, wie in Abschnitt 4.3.3.3 bereits beschrieben, STAT-1, CREB/ATF (vgl. auch [155] , NF- κ B, c-Ets-1, Foxp3, NFAT und Evi-1. In diesem Bereich liegen ebenfalls acht der 14 auf ihren Methylierungszustand analysierten CpG- Motive [1] . Dieses ist ein weiterer Umstand der für eine entscheidende Bedeutung des Methylierungsstatus der TSDR bei der Expression des murinen Foxp3- Gens spricht. Nach einer Überprüfung, welche der postulierten Transkriptionsfaktoren an die TSDR binden, ist ein weiterer Schritt die Analyse einer möglichen methylierungsabhängigen Bindung der Transkriptionsfaktoren an die TSDR. Bis jetzt ist diese Art der Bindung nur für CREB/ATF beschrieben worden [155]

6 Literaturverzeichnis

- [1] Floess, S.; Freyer, J.; Siewert, C.; Baron, U.; Olek, S.; Polansky, J.; Schlawe, K.; Chang, H.-D.; Bopp, T.; Schmitt, E.; Klein-Hessling, S.; Serfling, E.; Hamann, A. und Huehn, J. (2007): Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells, PLOS Biol (Band 5), Nr. 2, Seite e38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17298177
- [2] Kisielow, P.; Teh, H. S.; Bluthmann, H. und von Boehmer, H. (1988): Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules, Nature (Band 335), Nr. 6192, Seite 730-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3262831
- [3] Kappler, J. W.; Roehm, N. und Marrack, P. (1987): T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, Cell (Band 49), Nr. 2, Seite 273-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3494522
- [4] Arnold, B.; Schonrich, G. und Hammerling, G. J. (1993): Multiple levels of peripheral tolerance, Immunol Today (Band 14), Nr. 1, Seite 12-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8442855
- [5] Miller, J. F. und Heath, W. R. (1993): Self-ignorance in the peripheral T-cell pool, Immunol Rev (Band 133), Seite 131-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8225364
- [6] Van Parijs, L. und Abbas, A. K. (1998): Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off, Science (Band 280), Nr. 5361, Seite 243-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9535647
- [7] Sakaguchi, S. (2000): Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance, Cell (Band 101), Nr. 5, Seite 455-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.cell.com/cgi/content/full/101/5/455>
- [8] Nishizuka, Y. und Sakakura, T. (1969): Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice, Science (Band 166), Nr. 906, Seite 753-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5823314
- [9] Gershon, R. K. und Kondo, K. (1970): Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes, Immunology (Band 18), Nr. 5, Seite 723-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4911896
- [10] Golub, E. S. (1981): Suppressor T cells and their possible role in the regulation of autoreactivity, Cell (Band 24), Nr. 3, Seite 595-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6454494
- [11] Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. und Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, J Immunol (Band 155), Nr. 3, Seite 1151-64.
- [12] Ostroukhova, M.; Seguin-Devaux, C.; Oriss, T. B.; Dixon-McCarthy, B.; Yang, L.; Ameredes, B. T.; Corcoran, T. E. und Ray, A. (2004): Tolerance induced by inhaled antigen involves

- CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3, J Clin Invest (Band 114), Nr. 1, Seite 28-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15232609
- [13] Sakaguchi, S.; Ono, M.; Setoguchi, R.; Yagi, H.; Hori, S.; Fehervari, Z.; Shimizu, J.; Takahashi, T. und Nomura, T. (2006): Foxp3CD25CD4 natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease, Immunol Rev (Band 212), Seite 8-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16903903
- [14] Peng, Y.; Laouar, Y.; Li, M. O.; Green, E. A. und Flavell, R. A. (2004): TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 101), Nr. 13, Seite 4572-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15070759
- [15] Loser, K.; Hansen, W.; Apelt, J.; Balkow, S.; Buer, J. und Beissert, S. (2005): In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity, Gene Ther (Band 12), Nr. 17, Seite 1294-304. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15973443
- [16] Kretschmer, K.; Apostolou, I.; Jaeckel, E.; Khazaie, K. und von Boehmer, H. (2006): Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer, Immunol Rev (Band 212), Seite 163-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16903913
- [17] Chen, M. L.; Pittet, M. J.; Gorelik, L.; Flavell, R. A.; Weissleder, R.; von Boehmer, H. und Khazaie, K. (2005): Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 102), Nr. 2, Seite 419-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15623559
- [18] Hontsu, S.; Yoneyama, H.; Ueha, S.; Terashima, Y.; Kitabatake, M.; Nakano, A.; Ito, T.; Kimura, H. und Matsushima, K. (2004): Visualization of naturally occurring Foxp3+ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice, Int Immunopharmacol (Band 4), Nr. 14, Seite 1785-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15531294
- [19] Menning, A.; Höpken, U.E.; Siegmund, K.; Lipp, M.; Hamann, A. und Huehn, J. (2007): CCR7 is crucial for the functional activity of both naïve- and effector/memory-like regulatory T cells subsets, Eur J Imm (Band 37), Nr. 6, Seite 1575-1583.
- [20] Izcue, A.; Coombes, J. L. und Powrie, F. (2006): Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation, Immunol Rev (Band 212), Seite 256-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16903919
- [21] Denning, T. L.; Kim, G. und Kronenberg, M. (2005): Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis, J Immunol (Band 174), Nr. 12, Seite 7487-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15944246
- [22] Annacker, O.; Pimenta-Araujo, R.; Burlen-Defranoux, O. und Bandeira, A. (2001): On the ontogeny and physiology of regulatory T cells, Immunol Rev (Band 182), Seite 5-17. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722620
- [23] Khattni, R.; Cox, T.; Yasayko, S. A. und Ramsdell, F. (2003): An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 4, Seite 337-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12612581
- [24] Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. und Sakaguchi, S. (2002): Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 2, Seite 135-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11812990
- [25] Huehn, J.; Siegmund, K.; Lehmann, J.; Siewert, C.; Haubold, U.; Feuerer, M.; Debes, G. F.; Lauber, J.; Frey, O.; Przybylski, G. K.; Niesner, U.; Rosa, M. de la; Schmidt, C. A.; Bräuer, R.; Buer, J.; Scheffold, A. und Hamann, A. (2004): Developmental stage, phenotype and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells., *J Exp Med* (Band 199), Seite 303-313.
- [26] Bruder, D.; Probst-Keppler, M.; Westendorf, A. M.; Geffers, R.; Beissert, S.; Loser, K.; von Boehmer, H.; Buer, J. und Hansen, W. (2004): Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells, *Eur J Immunol* (Band 34), Nr. 3, Seite 623-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14991591
- [27] Hansen, W.; Loser, K.; Westendorf, A. M.; Bruder, D.; Pfoertner, S.; Siewert, C.; Huehn, J.; Beissert, S. und Buer, J. (2006): G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+CD25- T cells leads to the induction of Foxp3+ regulatory T cells in vivo, *J Immunol* (Band 177), Nr. 1, Seite 209-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16785516
- [28] Fantini, M. C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P. R. und Neurath, M. F. (2004): Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7, *J Immunol* (Band 172), Nr. 9, Seite 5149-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15100250
- [29] Lyon, M. F.; Peters, J.; Glenister, P. H.; Ball, S. und Wright, E. (1990): The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 7, Seite 2433-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2320565
- [30] Blair, P. J.; Bultman, S. J.; Haas, J. C.; Rouse, B. T.; Wilkinson, J. E. und Godfrey, V. L. (1994): CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse, *J Immunol* (Band 153), Nr. 8, Seite 3764-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7930593
- [31] Clark, L. B.; Appleby, M. W.; Brunkow, M. E.; Wilkinson, J. E.; Ziegler, S. F. und Ramsdell, F. (1999): Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant, *J Immunol* (Band 162), Nr. 5, Seite 2546-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10072494
- [32] Fontenot, J. D.; Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 4, Seite 330-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12612578

- [33] Williams, L. M. und Rudensky, A. Y. (2007): Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3, *Nat Immunol* (Band 8), Nr. 3, Seite 277-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17220892
- [34] Wan, Y. Y. und Flavell, R. A. (2007): Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression, *Nature* (Band 445), Nr. 7129, Seite 766-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17220876
- [35] Gambineri, E.; Torgerson, T. R. und Ochs, H. D. (2003): Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis, *Curr Opin Rheumatol* (Band 15), Nr. 4, Seite 430-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12819471
- [36] Kim, J. M.; Rasmussen, J. P. und Rudensky, A. Y. (2007): Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice, *Nat Immunol* (Band 8), Nr. 2, Seite 191-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17136045
- [37] Lahl, K.; Loddenkemper, C.; Drouin, C.; Freyer, J.; Arnason, J.; Eberl, G.; Hamann, A.; Wagner, H.; Huehn, J. und Sparwasser, T. (2007): Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease, *J Exp Med* (Band 204), Nr. 1, Seite 57-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17200412
- [38] Wan, Y. Y. und Flavell, R. A. (2005): Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 14, Seite 5126-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15795373
- [39] Sakaguchi, S.; Hori, S.; Fukui, Y.; Sasazuki, T.; Sakaguchi, N. und Takahashi, T. (2003): Thymic generation and selection of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunological self-tolerance, *Novartis Found Symp* (Band 252), Seite 6-16; discussion 16-23, 106-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14609209
- [40] Ribot, J.; Enault, G.; Pilipenko, S.; Huchencq, A.; Calise, M.; Hudrisier, D.; Romagnoli, P. und van Meerwijk, J. P. (2007): Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection, *J Immunol* (Band 179), Nr. 10, Seite 6741-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17982064
- [41] Maggi, E.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Romagnani, P.; Romagnani, S. und Annunziato, F. (2005): Thymic regulatory T cells, *Autoimmun Rev* (Band 4), Nr. 8, Seite 579-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16214099
- [42] Taams, L. S. und Akbar, A. N. (2005): Peripheral generation and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 293), Seite 115-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15981478
- [43] Weber, S. E.; Harbertson, J.; Godebu, E.; Mros, G. A.; Padrick, R. C.; Carson, B. D.; Ziegler, S. F. und Bradley, L. M. (2006): Adaptive islet-specific regulatory CD4⁺ T cells control autoimmune diabetes and mediate the disappearance of pathogenic Th1 cells in vivo, *J Immunol* (Band 176), Nr. 8, Seite 4730-9. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16585566
- [44] Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production, *J Exp Med* (Band 188), Nr. 2, Seite 287-96.
- [45] Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M.; Shimizu, J. und Sakaguchi, S. (1998): Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state, *Int Immunol* (Band 10), Nr. 12, Seite 1969-80.
- [46] Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (2000): Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific, *J Immunol* (Band 164), Nr. 1, Seite 183-90.
- [47] Stassen, M., S. Fondel, T. Bopp, C. Richter, C. Müller, J. Kubach, C. Becker, J. Knop, A.H. Enk, S. Schmitt, E. Schmitt, H. Jonuleit (2004): Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4\beta 7$ or $\alpha 4\beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells, *Eur J Immunol* (Band 34), Nr. 5, Seite 1303-1311.
- [48] Vieira, P. L.; Heystek, H. C.; Wormmeester, J.; Wierenga, E. A. und Kapsenberg, M. L. (2003): Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells, *J Immunol* (Band 170), Nr. 9, Seite 4483-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12707324
- [49] Bienvenu, B.; Martin, B.; Auffray, C.; Cordier, C.; Becourt, C. und Lucas, B. (2005): Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity, *J Immunol* (Band 175), Nr. 1, Seite 246-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15972655
- [50] Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. (2005): *Immunobiology* (Band 6th.), Harbor, J.
- [51] Koonpaew, S.; Shen, S.; Flowers, L. und Zhang, W. (2006): LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development, *J Exp Med* (Band 203), Nr. 1, Seite 119-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16380508
- [52] Mantel, P. Y.; Ouaked, N.; Ruckert, B.; Karagiannidis, C.; Welz, R.; Blaser, K. und Schmidt-Weber, C. B. (2006): Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells, *J Immunol* (Band 176), Nr. 6, Seite 3593-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16517728
- [53] Bopp, T.; Palmetshofer, A.; Serfling, E.; Heib, V.; Schmitt, S.; Richter, C.; Klein, M.; Schild, H.; Schmitt, E. und Stassen, M. (2005): NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells, *J Exp Med* (Band 201), Nr. 2, Seite 181-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15657288
- [54] Liang, S.; Alard, P.; Zhao, Y.; Parnell, S.; Clark, S. L. und Kosiewicz, M. M. (2005): Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus, *J Exp Med* (Band 201), Nr. 1, Seite 127-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15630140
- [55] Tai, X.; Cowan, M.; Feigenbaum, L. und Singer, A. (2005): CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 2, Seite 152-62. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15640801
- [56] Gavin, M. A.; Clarke, S. R.; Negrou, E.; Gallegos, A. und Rudensky, A. (2002): Homeostasis and anergy of CD4+CD25+ suppressor T cells in vivo, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 1, Seite 33-41.
- [57] Polanczyk, M. J.; Hopke, C.; Vandenbark, A. A. und Offner, H. (2006): Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway, *J Neurosci Res* (Band 84), Nr. 2, Seite 370-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16676326
- [58] Zorn, E.; Nelson, E. A.; Mohseni, M.; Porcheray, F.; Kim, H.; Litsa, D.; Bellucci, R.; Raderschall, E.; Canning, C.; Soiffer, R. J.; Frank, D. A. und Ritz, J. (2006): IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo, *Blood* (Band 108), Nr. 5, Seite 1571-1579. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16645171
- [59] Zheng, S. G.; Wang, J.; Wang, P.; Gray, J. D. und Horwitz, D. A. (2007): IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells, *J Immunol* (Band 178), Nr. 4, Seite 2018-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17277105
- [60] Bayer, A. L.; Yu, A. und Malek, T. R. (2007): Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells, *J Immunol* (Band 178), Nr. 7, Seite 4062-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17371960
- [61] Fontenot, J. D.; Rasmussen, J. P.; Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2005): A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 11, Seite 1142-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16227984
- [62] D'Cruz, L. M. und Klein, L. (2005): Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 11, Seite 1152-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16227983
- [63] Burchill, M. A.; Yang, J.; Vogtenhuber, C.; Blazar, B. R. und Farrar, M. A. (2007): IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells, *J Immunol* (Band 178), Nr. 1, Seite 280-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17182565
- [64] Kretschmer, K.; Apostolou, I.; Hawiger, D.; Khazaie, K.; Nussenzweig, M. C. und von Boehmer, H. (2005): Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen, *Nat Immunol* (Band 12), Seite 1219-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16244650
- [65] Selvaraj, R. K. und Geiger, T. L. (2007): A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta, *J Immunol* (Band 179), Nr. 2, Seite 11 p following 1390. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17695668

- [66] Cobbold, S. P.; Castejon, R.; Adams, E.; Zelenika, D.; Graca, L.; Humm, S. und Waldmann, H. (2004): Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants, *J Immunol* (Band 172), Nr. 10, Seite 6003-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15128783
- [67] Park, H. B.; Paik, D. J.; Jang, E.; Hong, S. und Youn, J. (2004): Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells, *Int Immunol* (Band 16), Nr. 8, Seite 1203-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15237111
- [68] Schramm, C.; Huber, S.; Protschka, M.; Czochra, P.; Burg, J.; Schmitt, E.; Lohse, A. W.; Galle, P. R. und Blessing, M. (2004): TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo, *Int Immunol* (Band 16), Nr. 9, Seite 1241-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15249539
- [69] Zhang, L.; Yi, H.; Xia, X. P. und Zhao, Y. (2006): Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance, *Autoimmunity* (Band 39), Nr. 4, Seite 269-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16891215
- [70] Rubtsov, Y. P. und Rudensky, A. Y. (2007): TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity, *Nat Rev Immunol* (Band 7), Nr. 6, Seite 443-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17525753
- [71] Tone, Y.; Furuuchi, K.; Kojima, Y.; Tykocinski, M. L.; Greene, M. I. und Tone, M. (2008): Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer, *Nat Immunol* (Band 9), Nr. 2, Seite 194-202. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18157133
- [72] Sun, C. M.; Hall, J. A.; Blank, R. B.; Bouladoux, N.; Oukka, M.; Mora, J. R. und Belkaid, Y. (2007): Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid, *J Exp Med*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17620362
- [73] Coombes, J. L.; Siddiqui, K. R.; Arancibia-Carcamo, C. V.; Hall, J.; Sun, C. M.; Belkaid, Y. und Powrie, F. (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism, *J Exp Med* (Band 204), Nr. 8, Seite 1757-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17620361
- [74] Benson, M. J.; Pino-Lagos, K.; Roseblatt, M. und Noelle, R. J. (2007): All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation, *J Exp Med* (Band 204), Nr. 8, Seite 1765-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17620363
- [75] Mucida, D.; Park, Y.; Kim, G.; Turovskaya, O.; Scott, I.; Kronenberg, M. und Cheroutre, H. (2007): Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid, *Science* (Band 317), Nr. 5835, Seite 256-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17569825
- [76] Gandhi, R.; Anderson, D. E. und Weiner, H. L. (2007): Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-

- dependent manner, J Immunol (Band 178), Nr. 7, Seite 4017-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17371954
- [77] Kang, S. G.; Lim, H. W.; Andrisani, O. M.; Broxmeyer, H. E. und Kim, C. H. (2007): Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3⁺ regulatory T cells, J Immunol (Band 179), Nr. 6, Seite 3724-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17785809
- [78] Liu, H.; Komai-Koma, M.; Xu, D. und Liew, F. Y. (2006): Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 103), Nr. 18, Seite 7048-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16632602
- [79] Suttmüller, R. P.; den Brok, M. H.; Kramer, M.; Bennink, E. J.; Toonen, L. W.; Kullberg, B. J.; Joosten, L. A.; Akira, S.; Netea, M. G. und Adema, G. J. (2006): Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells, J Clin Invest (Band 116), Nr. 2, Seite 485-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16424940
- [80] Nishikawa, H.; Kato, T.; Tawara, I.; Saito, K.; Ikeda, H.; Kuribayashi, K.; Allen, P. M.; Schreiber, R. D.; Sakaguchi, S.; Old, L. J. und Shiku, H. (2005): Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, J Exp Med (Band 201), Nr. 5, Seite 681-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15753203
- [81] Kabelitz, D.; Wesch, D. und Oberg, H. H. (2006): Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors, Crit Rev Immunol (Band 26), Nr. 4, Seite 291-306. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17073555
- [82] Sanchez-Guajardo, V.; Tanchot, C.; O'Malley, J. T.; Kaplan, M. H.; Garcia, S. und Freitas, A. A. (2007): Agonist-driven development of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6, J Immunol (Band 178), Nr. 12, Seite 7550-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17548589
- [83] Bettelli, E.; Oukka, M. und Kuchroo, V. K. (2007): T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity, Nat Immunol (Band 8), Nr. 4, Seite 345-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17375096
- [84] Cobb, B. S.; Hertweck, A.; Smith, J.; O'Connor, E.; Graf, D.; Cook, T.; Smale, S. T.; Sakaguchi, S.; Livesey, F. J.; Fisher, A. G. und Merkenschlager, M. (2006): A role for Dicer in immune regulation, J Exp Med (Band 203), Nr. 11, Seite 2519-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17060477
- [85] Marson, A.; Kretschmer, K.; Frampton, G. M.; Jacobsen, E. S.; Polansky, J. K.; MacIsaac, K. D.; Levine, S. S.; Fraenkel, E.; von Boehmer, H. und Young, R. A. (2007): Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation, Nature (Band 445), Nr. 7130, Seite 931-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17237765
- [86] Zheng, Y.; Josefowicz, S. Z.; Kas, A.; Chu, T. T.; Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2007): Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells,

- Nature (Band 445), Nr. 7130, Seite 936-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17237761
- [87] Schubert, L. A.; Jeffery, E.; Zhang, Y.; Ramsdell, F. und Ziegler, S. F. (2001): Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation, J Biol Chem (Band 276), Nr. 40, Seite 37672-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11483607
- [88] Bettelli, E.; Dastrange, M. und Oukka, M. (2005): Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 102), Nr. 14, Seite 5138-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15790681
- [89] Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A. D.; Stroud, J. C.; Bates, D. L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S. F.; Mathis, D.; Benoist, C.; Chen, L. und Rao, A. (2006): FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT, Cell (Band 126), Nr. 2, Seite 375-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16873067
- [90] Ono, M.; Yaguchi, H.; Ohkura, N.; Kitabayashi, I.; Nagamura, Y.; Nomura, T.; Miyachi, Y.; Tsukada, T. und Sakaguchi, S. (2007): Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1, Nature (Band 446), Nr. 7136, Seite 685-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17377532
- [91] Chen, C.; Rowell, E. A.; Thomas, R. M.; Hancock, W. W. und Wells, A. D. (2006): Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation, J Biol Chem (Band 281), Nr. 48, Seite 36828-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17028180
- [92] Li, B.; Samanta, A.; Song, X.; Iacono, K. T.; Bembas, K.; Tao, R.; Basu, S.; Riley, J. L.; Hancock, W. W.; Shen, Y.; Saouaf, S. J. und Greene, M. I. (2007): FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 104), Nr. 11, Seite 4571-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17360565
- [93] Knippers, R (2003): Molekulare Genetik (Band 8. Auflage).
- [94] Reik, W.; Kelsey, G. und Walter, J. (1999): Dissecting de novo methylation, Nat Genet (Band 23), Nr. 4, Seite 380-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10581015
- [95] Choi, Y.; Gehring, M.; Johnson, L.; Hannon, M.; Harada, J. J.; Goldberg, R. B.; Jacobsen, S. E. und Fischer, R. L. (2002): DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis, Cell (Band 110), Nr. 1, Seite 33-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12150995
- [96] Barreto, G.; Schafer, A.; Marhold, J.; Stach, D.; Swaminathan, S. K.; Handa, V.; Doderlein, G.; Maltry, N.; Wu, W.; Lyko, F. und Niehrs, C. (2007): Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation, Nature (Band 445), Nr. 7128, Seite 671-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17268471

- [97] Agarwal, S.; Viola, J. P. und Rao, A. (1999): Chromatin-based regulatory mechanisms governing cytokine gene transcription, *J Allergy Clin Immunol* (Band 103), Nr. 6, Seite 990-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359875
- [98] Lee, G. R.; Spilianakis, C. G. und Flavell, R. A. (2005): Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 1, Seite 42-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15608641
- [99] Tykocinski, L. O.; Hajkova, P.; Chang, H. D.; Stamm, T.; Sozeri, O.; Lohning, M.; Hu-Li, J.; Niesner, U.; Kreher, S.; Friedrich, B.; Pannetier, C.; Grutz, G.; Walter, J.; Paul, W. E. und Radbruch, A. (2005): A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 31, Seite 28177-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15941711
- [100] Shin, H. J.; Park, H. Y.; Jeong, S. J.; Park, H. W.; Kim, Y. K.; Cho, S. H.; Kim, Y. Y.; Cho, M. L.; Kim, H. Y.; Min, K. U. und Lee, C. W. (2005): STAT4 expression in human T cells is regulated by DNA methylation but not by promoter polymorphism, *J Immunol* (Band 175), Nr. 11, Seite 7143-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16301617
- [101] Murayama, A.; Sakura, K.; Nakama, M.; Yasuzawa-Tanaka, K.; Fujita, E.; Tateishi, Y.; Wang, Y.; Ushijima, T.; Baba, T.; Shibuya, K.; Shibuya, A.; Kawabe, Y. und Yanagisawa, J. (2006): A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory, *Embo J* (Band 25), Nr. 5, Seite 1081-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16498406
- [102] Floess, S.; Freyer, J.; Siewert, C.; Baron, U.; Olek, S.; Polansky, J.; Schlawe, K.; Chang, H. D.; Bopp, T.; Schmitt, E.; Klein-Hessling, S.; Serfling, E.; Hamann, A. und Huehn, J. (2007): Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells, *PLoS Biol* (Band 5), Nr. 2, Seite e38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17298177
- [103] Allis, C. D.; Berger, S. L.; Cote, J.; Dent, S.; Jenuwien, T.; Kouzarides, T.; Pillus, L.; Reinberg, D.; Shi, Y.; Shiekhata, R.; Shilatifard, A.; Workman, J. und Zhang, Y. (2007): New nomenclature for chromatin-modifying enzymes, *Cell* (Band 131), Nr. 4, Seite 633-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18022353
- [104] Kouzarides, T. (2007): SnapShot: Histone-Modifying Enzymes, *Cell* (Band 131), Nr. 4, Seite 822. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18022374
- [105] Chang, S. und Aune, T. M. (2005): Histone hyperacetylated domains across the Ifng gene region in natural killer cells and T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 47, Seite 17095-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16286661
- [106] Lucas, M.; Zhang, X.; Prasanna, V. und Mosser, D. M. (2005): ERK activation following macrophage FcgammaR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus, *J Immunol* (Band 175), Nr. 1, Seite 469-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15972681

- [107] Su, L.; Creusot, R. J.; Gallo, E. M.; Chan, S. M.; Utz, P. J.; Fathman, C. G. und Ermann, J. (2004): Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene, *J Immunol* (Band 173), Nr. 8, Seite 4994-5001. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15470042
- [108] D'Alessio, A. C. und Szyf, M. (2006): Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation, *Biochem Cell Biol* (Band 84), Nr. 4, Seite 463-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16936820
- [109] Zhao, S.; Malek, J.; Mahairas, G.; Fu, L.; Nierman, W.; Venter, J. C. und Adams, M. D. (2000): Human BAC ends quality assessment and sequence analyses, *Genomics* (Band 63), Nr. 3, Seite 321-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10704280
- [110] Osoegawa, K.; Tateno, M.; Woon, P. Y.; Frengen, E.; Mammoser, A. G.; Catanese, J. J.; Hayashizaki, Y. und de Jong, P. J. (2000): Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis, *Genome Res* (Band 10), Nr. 1, Seite 116-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10645956
- [111] McPherson, J. D.; Marra, M.; Hillier, L.; Waterston, R. H.; Chinwalla, A.; Wallis, J.; Sekhon, M.; Wylie, K.; Mardis, E. R.; Wilson, R. K.; Fulton, R.; Kucaba, T. A.; Wagner-McPherson, C.; Barbazuk, W. B.; Gregory, S. G.; Humphray, S. J.; French, L.; Evans, R. S.; Bethel, G.; Whittaker, A.; Holden, J. L.; McCann, O. T.; Dunham, A.; Soderlund, C.; Scott, C. E.; Bentley, D. R.; Schuler, G.; Chen, H. C.; Jang, W.; Green, E. D.; Idol, J. R.; Maduro, V. V.; Montgomery, K. T.; Lee, E.; Miller, A.; Emerling, S.; Kucherlapati, Gibbs, R.; Scherer, S.; Gorrell, J. H.; Sodergren, E.; Clerc-Blankenburg, K.; Tabor, P.; Naylor, S.; Garcia, D.; de Jong, P. J.; Catanese, J. J.; Nowak, N.; Osoegawa, K.; Qin, S.; Rowen, L.; Madan, A.; Dors, M.; Hood, L.; Trask, B.; Friedman, C.; Massa, H.; Cheung, V. G.; Kirsch, I. R.; Reid, T.; Yonescu, R.; Weissenbach, J.; Bruls, T.; Heilig, R.; Branscomb, E.; Olsen, A.; Doggett, N.; Cheng, J. F.; Hawkins, T.; Myers, R. M.; Shang, J.; Ramirez, L.; Schmutz, J.; Velasquez, O.; Dixon, K.; Stone, N. E.; Cox, D. R.; Haussler, D.; Kent, W. J.; Furey, T.; Rogic, S.; Kennedy, S.; Jones, S.; Rosenthal, A.; Wen, G.; Schilhabel, M.; Gloeckner, G.; Nyakatura, G.; Siebert, R.; Schlegelberger, B.; Korenberg, J.; Chen, X. N.; Fujiyama, A.; Hattori, M.; Toyoda, A.; Yada, T.; Park, H. S.; Sakaki, Y.; Shimizu, N.; Asakawa, S.; Kawasaki, K.; Sasaki, T.; Shintani, A.; Shimizu, A.; Shibuya, K.; Kudoh, J.; Minoshima, S.; Ramser, J.; Seranski, P.; Hoff, C.; Poustka, A.; Reinhardt, R. und Lehrach, H. (2001): A physical map of the human genome, *Nature* (Band 409), Nr. 6822, Seite 934-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11237014
- [112] Sparwasser, T.; Gong, S.; Li, J. Y. und Eberl, G. (2004): General method for the modification of different BAC types and the rapid generation of BAC transgenic mice, *Genesis* (Band 38), Nr. 1, Seite 39-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14755803
- [113] Muyrers, J. P.; Zhang, Y.; Testa, G. und Stewart, A. F. (1999): Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination, *Nucleic Acids Res* (Band 27), Nr. 6, Seite 1555-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10037821
- [114] Zhang, Y.; Muyrers, J. P.; Testa, G. und Stewart, A. F. (2000): DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*, *Nat Biotechnol* (Band 18), Nr. 12, Seite 1314-7. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11101815
- [115] Capecchi, M. R. (1989): Altering the genome by homologous recombination, Science (Band 244), Nr. 4910, Seite 1288-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2660260
- [116] Capecchi, M. R. (1989): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting, Trends Genet (Band 5), Nr. 3, Seite 70-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2660363
- [117] Copeland, N. G.; Jenkins, N. A. und Court, D. L. (2001): Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics, Nat Rev Genet (Band 2), Nr. 10, Seite 769-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11584293
- [118] te Riele, H.; Maandag, E. R. und Berns, A. (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 89), Nr. 11, Seite 5128-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1594621
- [119] Lewandoski, M. (2001): Conditional control of gene expression in the mouse, Nat Rev Genet (Band 2), Nr. 10, Seite 743-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11584291
- [120] O'Gorman, S.; Fox, D. T. und Wahl, G. M. (1991): Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells, Science (Band 251), Nr. 4999, Seite 1351-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1900642
- [121] Roden, L. C.; Gottgens, B. und Mutasa-Gottgens, E. S. (2005): Protocol: precision engineering of plant gene loci by homologous recombination cloning in Escherichia coli, Plant Methods (Band 1), Nr. 1, Seite 6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16270944
- [122] Ralph, P. (1973): Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta + - lymphomas: sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin, J Immunol (Band 110), Nr. 6, Seite 1470-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4541304
- [123] Shimonkevitz, R.; Colon, S.; Kappler, J. W.; Marrack, P. und Grey, H. M. (1984): Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen, J Immunol (Band 133), Nr. 4, Seite 2067-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6332146
- [124] Kubo, R. T.; Born, W.; Kappler, J. W.; Marrack, P. und Pigeon, M. (1989): Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors, J Immunol (Band 142), Nr. 8, Seite 2736-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2467936
- [125] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=271968

- [126] Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 7), Nr. 6, Seite 1513-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=388356
- [127] Wallace, D. M. (1987): Precipitation of nucleic acids, *Methods Enzymol* (Band 152), Seite 41-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2443803
- [128] Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* (Band 155), Seite 335-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3431465
- [129] Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* (Band 166), Nr. 4, Seite 557-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6345791
- [130] Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* (Band 98), Nr. 3, Seite 503-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1195397
- [131] Brunkow, M. E.; Jeffery, E. W.; Hjerrild, K. A.; Paeper, B.; Clark, L. B.; Yasayko, S. A.; Wilkinson, J. E.; Galas, D.; Ziegler, S. F. und Ramsdell, F. (2001): Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nat Genet* (Band 27), Nr. 1, Seite 68-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11138001
- [132] Medeiros, R. B.; Burbach, B. J.; Mueller, K. L.; Srivastava, R.; Moon, J. J.; Highfill, S.; Peterson, E. J. und Shimizu, Y. (2007): Regulation of NF-kappaB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1, *Science* (Band 316), Nr. 5825, Seite 754-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17478723
- [133] Ruefli-Brasse, A. A.; French, D. M. und Dixit, V. M. (2003): Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase, *Science* (Band 302), Nr. 5650, Seite 1581-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14576442
- [134] Serfling, E.; Klein-Hessling, S.; Palmetshofer, A.; Bopp, T.; Stassen, M. und Schmitt, E. (2006): NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance, *Eur J Immunol* (Band 36), Nr. 11, Seite 2837-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17039563
- [135] Hu, H.; Djuretic, I.; Sundrud, M. S. und Rao, A. (2007): Transcriptional partners in regulatory T cells: Foxp3, Runx and NFAT, *Trends Immunol* (Band 28), Nr. 8, Seite 329-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17618833
- [136] Ho, L. und Crabtree, G. (2006): A Foxy tango with NFAT, *Nat Immunol* (Band 7), Nr. 9, Seite 906-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16924253
- [137] Gierl, M. S.; Karoulias, N.; Wende, H.; Strehle, M. und Birchmeier, C. (2006): The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal

- endocrine cells, *Genes Dev* (Band 20), Nr. 17, Seite 2465-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16951258
- [138] Lee, E. C.; Yu, D.; Martinez de Velasco, J.; Tessarollo, L.; Swing, D. A.; Court, D. L.; Jenkins, N. A. und Copeland, N. G. (2001): A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA, *Genomics* (Band 73), Nr. 1, Seite 56-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11352566
- [139] Winterhager, E.; Pielensticker, N.; Freyer, J.; Ghanem, A.; Schrickel, J. W.; Kim, J. S.; Behr, R.; Grummer, R.; Maass, K.; Urschel, S.; Lewalter, T.; Tiemann, K.; Simoni, M. und Willecke, K. (2007): Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart, *BMC Dev Biol* (Band 7), Seite 26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17408477
- [140] Lin, W.; Haribhai, D.; Relland, L. M.; Truong, N.; Carlson, M. R.; Williams, C. B. und Chatila, T. A. (2007): Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3, *Nat Immunol* (Band 8), Nr. 4, Seite 359-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17273171
- [141] Liu, Y.; Amarnath, S. und Chen, W. (2006): Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4+CD25+ Tregs from thymic CD4+CD25- single positive T cells, *Transplantation* (Band 82), Nr. 7, Seite 953-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17038912
- [142] Koonpaew, S.; Shen, S.; Flowers, L. und Zhang, W. (2005): LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development, *J Exp Med*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16380508
- [143] Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K. J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G. und Wahl, S. M. (2003): Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *J Exp Med* (Band 198), Nr. 12, Seite 1875-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676299
- [144] Marie, J. C.; Letterio, J. J.; Gavin, M. und Rudensky, A. Y. (2005): TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells, *J Exp Med* (Band 201), Nr. 7, Seite 1061-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15809351
- [145] Polanczyk, M. J.; Carson, B. D.; Subramanian, S.; Afentoulis, M.; Vandenbark, A. A.; Ziegler, S. F. und Offner, H. (2004): Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment, *J Immunol* (Band 173), Nr. 4, Seite 2227-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15294932
- [146] Davidson, T. S.; DiPaolo, R. J.; Andersson, J. und Shevach, E. M. (2007): Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells, *J Immunol* (Band 178), Nr. 7, Seite 4022-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17371955

- [147] Hori, S.; Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* (Band 299), Nr. 5609, Seite 1057-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12522256
- [148] Zwar, T. D.; van Driel, I. R. und Gleeson, P. A. (2006): Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4+CD25+ immunoregulatory T cells, *Immunol Cell Biol* (Band 84), Nr. 6, Seite 487-501. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16956386
- [149] Jonsson, H. und Peng, S. L. (2005): Forkhead transcription factors in immunology, *Cell Mol Life Sci* (Band 62), Nr. 4, Seite 397-409. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15719167
- [150] Lewin, B (2000): *Genes VII* (Band 7th).
- [151] Pyzik, M. und Piccirillo, C. A. (2007): TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets, *J Leukoc Biol* (Band 82), Nr. 2, Seite 335-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17475784
- [152] Ehrlich, K. C.; Cary, J. W. und Ehrlich, M. (1992): A broad bean cDNA clone encoding a DNA-binding protein resembling mammalian CREB in its sequence specificity and DNA methylation sensitivity, *Gene* (Band 117), Nr. 2, Seite 169-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1386331
- [153] Perkins, A. S.; Fishel, R.; Jenkins, N. A. und Copeland, N. G. (1991): Evi-1, a murine zinc finger proto-oncogene, encodes a sequence-specific DNA-binding protein, *Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 5, Seite 2665-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2017172
- [154] Kurokawa, M.; Mitani, K.; Irie, K.; Matsuyama, T.; Takahashi, T.; Chiba, S.; Yazaki, Y.; Matsumoto, K. und Hirai, H. (1998): The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3, *Nature* (Band 394), Nr. 6688, Seite 92-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9665135
- [155] Kim, H. P. und Leonard, W. J. (2007): CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation, *J Exp Med* (Band 204), Nr. 7, Seite 1543-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17591856

7 Anhang

7.1 Kommerzielle Sequenzierung (Agowa)

7.1.1 Sequenzierung des Zielgenvektors pBSK5'eYFPpA_{luc}

7.1.1.1 mit dem Primer T3

```

GTCGTGGCCA GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCTTGCA GTTCATTGAG
CACCGGACAG GTCGTCTTGA CAAAAAGAAC CGGGCGCCCG TCGCTGACA
GCCGGAACAC GGCGGCATCA GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TCCCAGTCA
TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC GGAGAACCTG CGTGCAATCC
ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT TGATCGATCT TTGCAAAAGC
TTGCAAAAGC CTAGGCCTCC AAAAAAGCCT CCTCACTACT TCTGGAATAG
CTCAGAGGCC GAGGCGGCCT CGGCCTCTGC ATAAATAAAA AAAATTAGTC
ATGCCATGGG GCGGAGAATG GGCGGAACTG GGCGGACTTA GGGGCGGGAT
GGGCGGACTT AGGGGCGGGA CTATGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC
TTTGCACTAT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCTGGTT
GCTGACTAAT TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC
TGGGGACTTT CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGGTTCTTTC
CGCCTCAGGA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA
ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG CCCGGGGAAG
TTCTTATACT TTCTAGAGAA TAGGAACCTC GGAATAGGAA CTTCGTAAAC
GTTTCGTACGA GAATGGATCC AAGCCTATGG CTCCTTCCTT GGCCCTTGGC
CCATCCCCAG GAGTCTTGCC AAGCTGGAAG ACTGCACCCA AGGGCTCAGA
ACTTCTAGGG ACCAGGGGCT CTGGGGGACC CTTCCAAGGT CGGGACCTGC
GAAGTGGGGC CCACACCTCT TCTTCCTTGA ACCCCCTGCC ACCATCCCAG
CTGCAGGTGA GGCCCGGGGC CCAGAAATGGG GTAAGCAGGG TGGGGTACTT
GGGCCTATAG GTGTCGACCT TTACTGTGGA CTAGTTCTAG AGCGGCCGCG

```

Abbildung 30: **Graphische Darstellung der Sequenzierung des Zielgenvektors pBSK5'eYFPpA_{luc} mit dem Primer T3**

Rot unterlegt: Sequenz der dualen Neo/Kan- Kasette

Kursiv: 3' homologe Region

Fett: Sequenz des pBSK II SK (+)

7.1.1.2 mit dem Primer T7

TATGTGGCCT GCACAGAGTG CAGGGGGTAC TGGAGGGTCC CACAAACCAA
 CTCCCCATCA CCCCACATTC ACGACAGAGT GGTATGGTGT ATGTAAGCAA
 GTGAGGTGCT GGACATGTGC ATGTGTAGAA TATATCCATC AATCTGTGTT
 CCTGCTGTCA GGGTAGCATA TATGTATGTA AGACAGACCA GAGGTGTAGT
 TATGAGGCTA TCTTGACCA CCCCTGGAAT GCATGTGACT CCCCTGGAAT
 GCATGTGACT CCATTCCACT GTTATCCCTG CAGCCTGCCT CTGACAAGAA
 CCCCATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCCATCC
 TGGTCGAGCT GGACGCGCAC GTAAACGGCC ACAAGTTCAG CGTGTCCGGC
 GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG CTGACCCTGA AGTTCATCTG
 CACCACCGGC AAGCTGCCCCG TGCCCTGGCC CACCCTCGTG ACCACCTTCG
 GCTACGGCCT GCAGTGCTTC GCCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC
 GACTTCTTCA AGTCCGCATG CCCGAAGGCT ACGTCCAGGA GCGCACCATC
 TTCTTCAAGG ACGACGGCAA CTACAAGACC CGCGCCGAGG TGAAGTTCGA
 GGGCGACACC CTGGTGAACC GCATCGAGCT GAAGGGCATC GACTTCAAGG
 AGGACGGCAA CATCCTGGGG CACAAGCTGG AGTACAATA CAACAGCCAC
 AACGTCTATA TCATGGCCGA CAAGCAGAAG AACGGCATCA AGGTGAACTT
 CAAGATCCGC CACAACATCG AGGACGGCAG CGTGCAGCTC GCCGACCACT
 ACCAGCAGAA CACCCCCATC GGCGACGGCC CCGTGCTGCT GCCCGACAAC
 CACTACCTGA GCTACCAGTC CGCCCTGAGC AAAGACCCCA ACGAGAAGCG
 CGATCACATG GTCTGTCTGG AGTTCGTGAC CGCCGCCGGG ATCACTCTCG
 GCATGGACGA GCTGTACAAG TAAAGCGGCC GGCCGCGACT CTAGCTAGAT
 ACCTAGGTGA GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC
 CATCTGTTGT TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC
 ACTCCCACTG TCCTTTCCTA **ATAAAATGAG** **GAAATTGCAT** CGCATTGTCT
 GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG GGTGG

Abbildung 31: Graphische Darstellung der Sequenzierung des Zielgenvektors pBSK5'eYFPpA_{dual3}' mit dem Primer T7

Kursiv: 5'homologe Region

Gelb unterlegt: kodierende Region des eYFPs

Fett: Hauptsequenz des PolyA

7.2 Methylierungsanalyse (Epiontis)

Tabelle 17: Originalwerte zur Methylierungsanalyse

TGF-βAmp1	TGF-β/NeutralAmp1
0,29	1

0,51	1
0,57	1
0,435	1
0,67	1
0,595	1
0,845	1
0,885	1
1	1
0,84	1
0,43	1
0,48	1
Amp2	Amp2
0,9	1
1	1
0,795	1
0,46	1
0,62	1
0,44	1
0,485	1
0,45	1

HUE43: Sechs Tage mit TGF- β kultivierte CD4⁺CD25⁻ T- Zellen

HUE45: Sechs Tage mit TGF- β und nach Restimulation ohne TGF- β kultivierte CD4⁺CD25⁻ T- Zellen

Amp1: Amplikon 1 ; Amp2: Amplikon 2 ; 1 = vollständig methyliert; 0 = vollständig demethyliert

7.3 Vektorkarten verwendeter Klonierungsvektoren

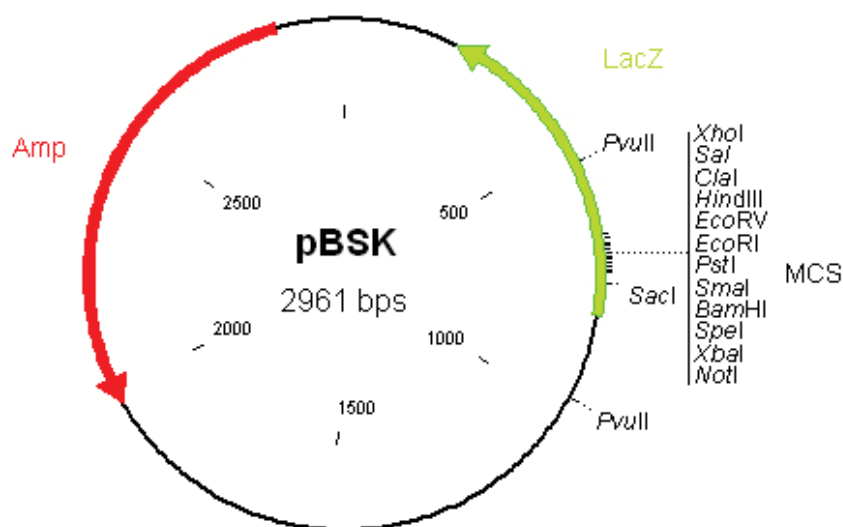


Abbildung 32: Übersicht des Klonierungsvektors pBluescript II SK (2+)

MCS= multiple Klonierungsstelle; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; LacZ= LacZ Gen (β - Galaktosidase) zur alpha- Komplementation, Nachweis rekombinierter Plasmide über blau/weiß- Selektion

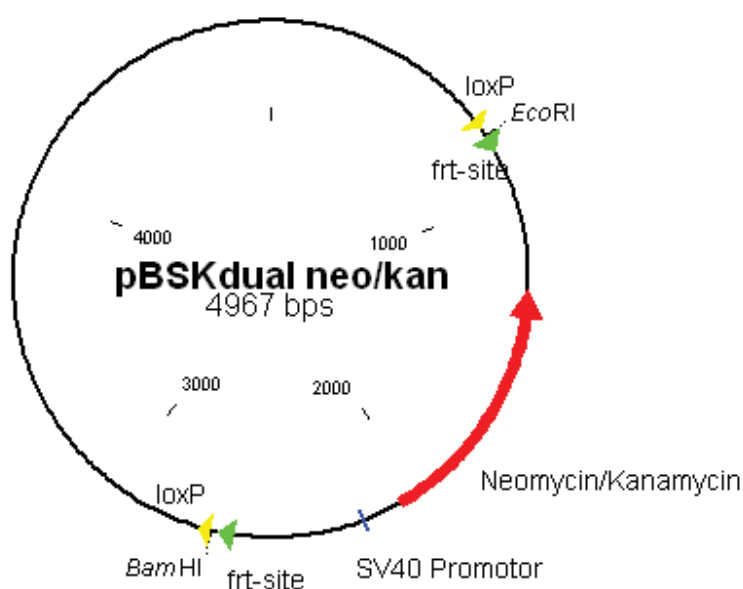


Abbildung 33: Übersicht des Klonierungsvektor pBSK mit dualer Resistenzkassette

MCS= multiple Klonierungsstelle; neo= Neomycin; kan= Kanamycin; frt- site= Flp- Erkennungsstelle; loxP= Cre- Erkennungsstelle; pBSK= pBluescript II SK (2+)

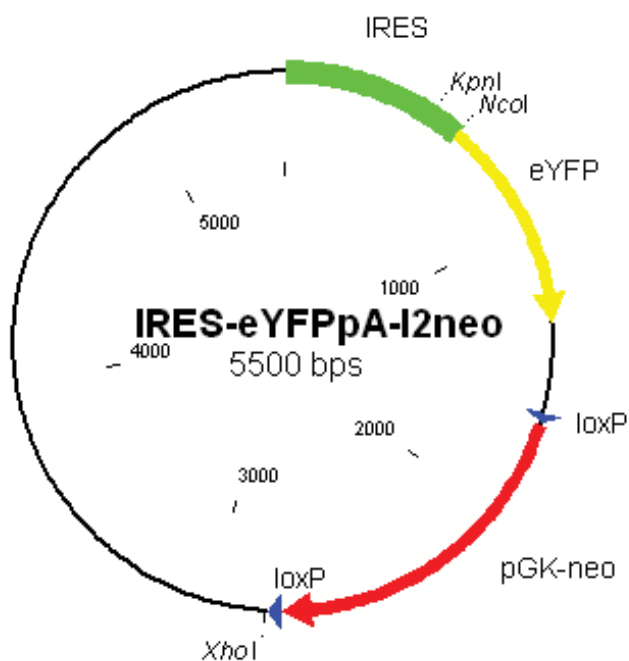


Abbildung 34: Übersicht des Klonierungsvektor von Markus Mohrs

IRES= internal ribosome entry site; pGK-neo= Neomycin- Resistenzgen; eYFP= enhanced yellow fluorescence protein; loxP= Cre- Erkennungsstelle; I2= IL-2, Interleukin 2; pA= Polyadenylierungssignal

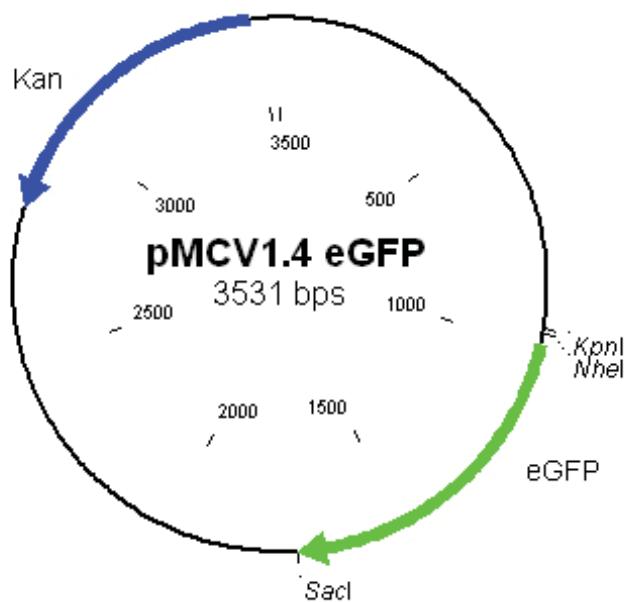


Abbildung 35: Übersicht über Transfektionsvektor pMCV 1.4 eGFP

Kan= Kanamycin- Resistenzgen; MCV= Cytomegalovirus; eGFP= enhanced Green fluorescence protein

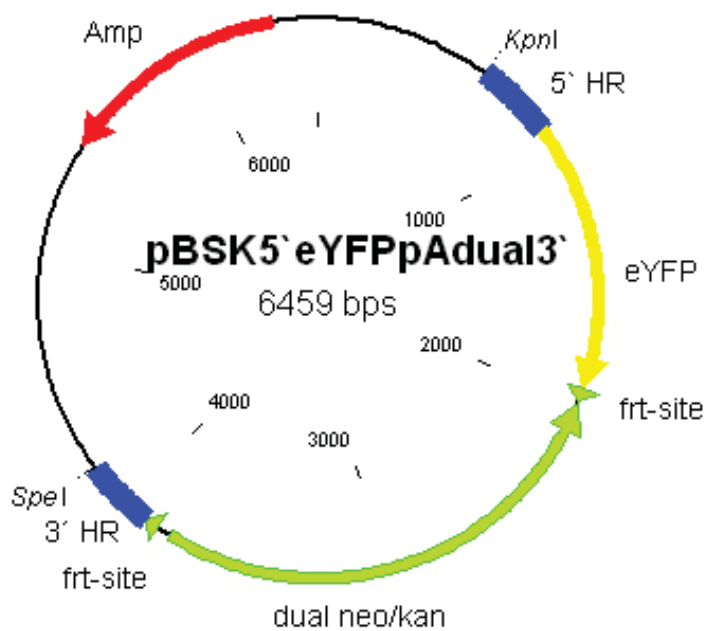


Abbildung 36: Übersicht des Zielgenvektors 5'eYFPpA dual3'

pBSK= pBluescript II SK (2+); dual neo/kann= duales Neomycin- und Kanamycin- Resistenzgen; frt- site= Flp-Erkennungsstelle; 3'HR= 3'homologe region; 5'HR= 5'homologe Region; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; eYFP= enhanced Yellow fluorescenc protein; pA= Polyadenylierungssignal

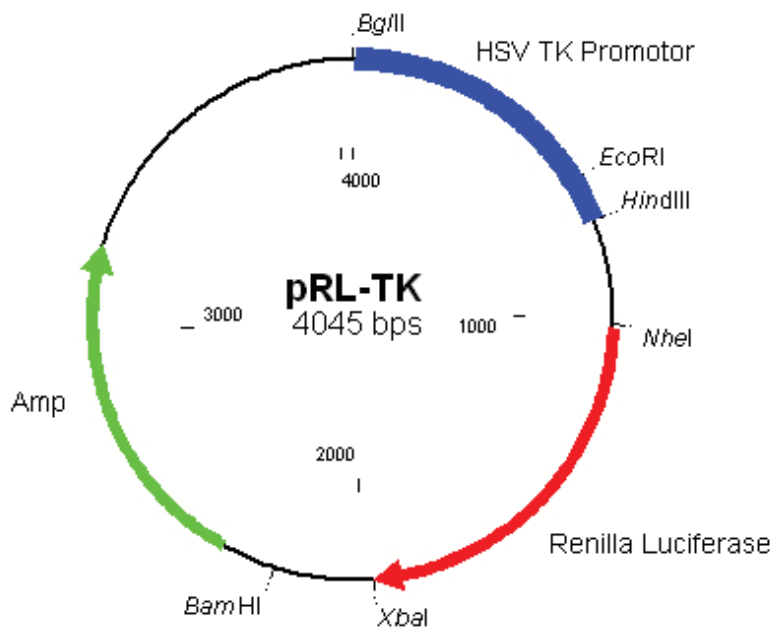


Abbildung 37: Übersicht des Reportervektors pRL-TK

RL= Renilla Luciferasegen; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; HSV TK= Herpes simplex Virus Thymidinkinase Promoter

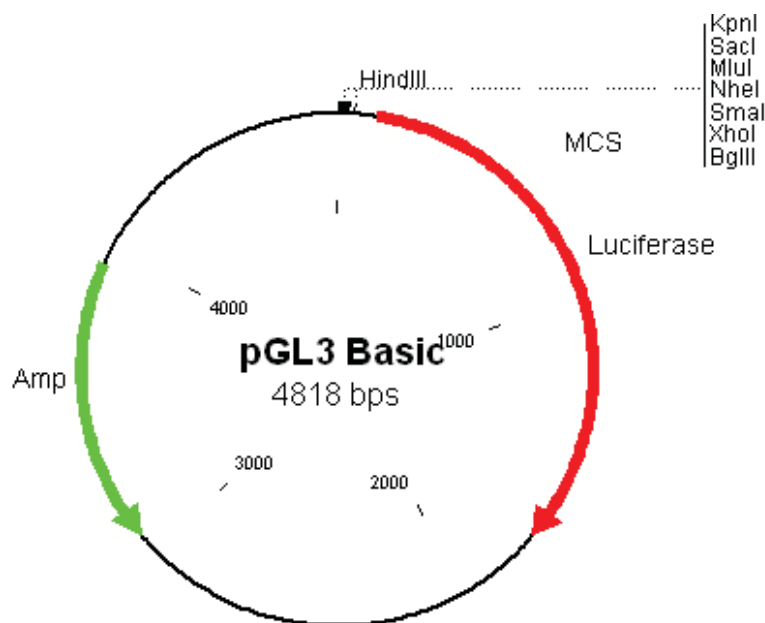


Abbildung 38: Übersicht über Klonierungsvektor pGL3Basic

Amp= Ampicillin- Resistenzgen; Luciferase= Luciferasegen (*Photinus pyralis*); pGL3Basic= Luciferase Reporter Vektor von Promega

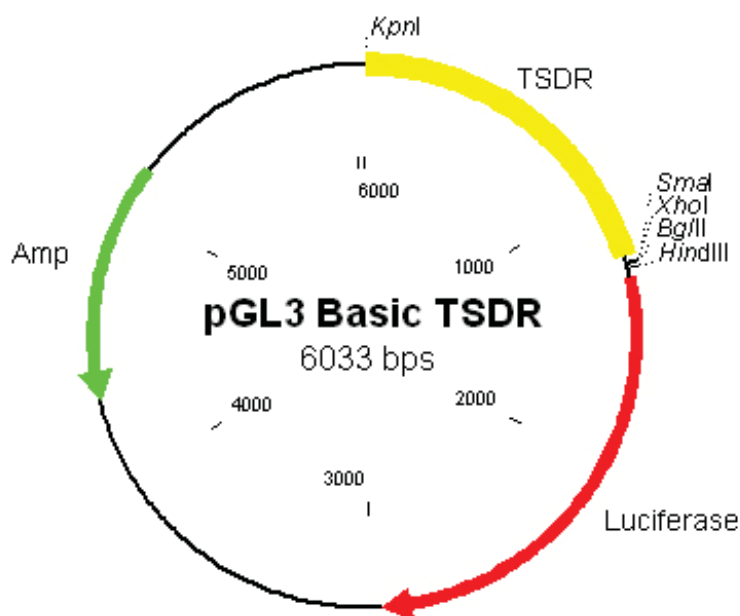


Abbildung 39: Übersicht des Reportervektors pGL3BasicTSDR

pGL3basic= Luciferase Reporter Vektor von Promega; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; Luciferase= Luciferasegen (*Photinus pyralis*); TSDR= Treg specific demethylated region

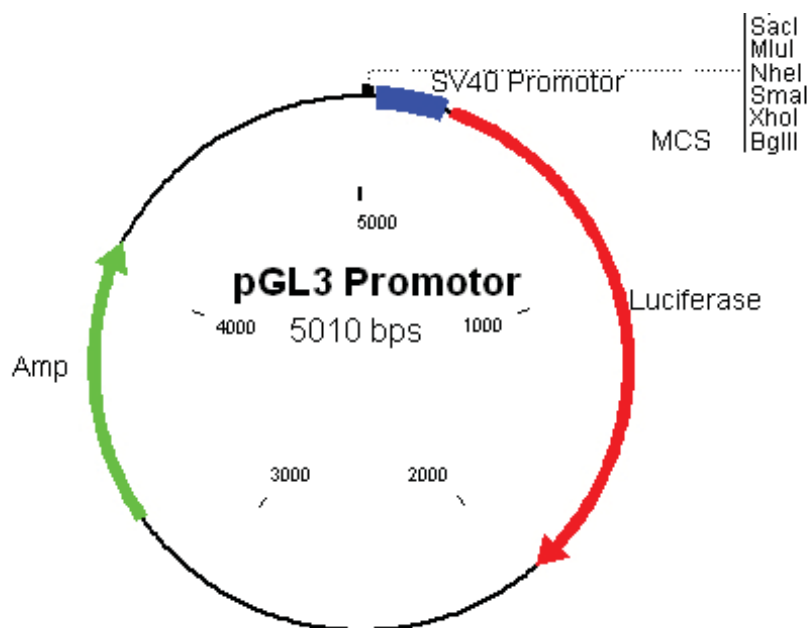


Abbildung 40: Übersicht des Klonierungsvektors pGL3Promoter

pGL3Promoter= Luciferase Reporter Vektor von Promega; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; Luciferase= Luciferasegen (*Photinus pyralis*); SV40 Promoter= minimaler *Simian vacuolating virus 40* Promoter

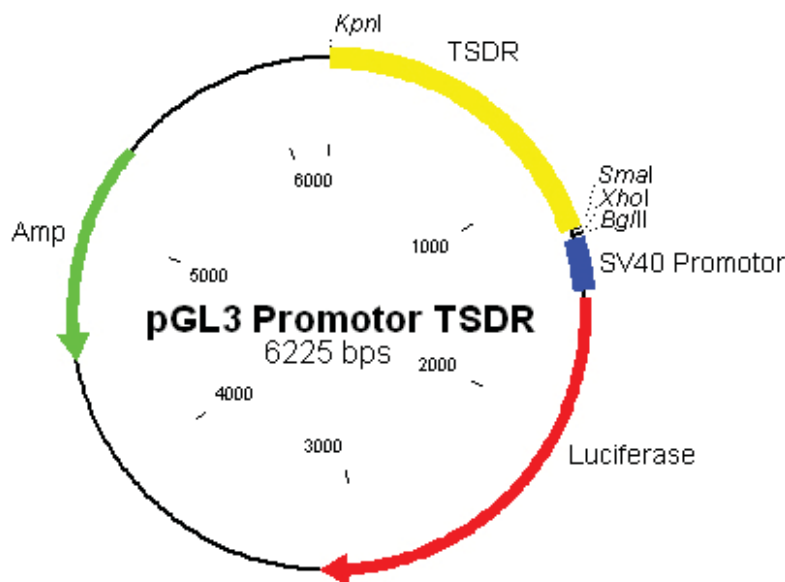


Abbildung 41: Übersicht des Repotervektors pGL3Promoter TSDR

pGL3Promoter= Luciferase Reporter Vektor von Promega; Amp= Ampicillin- Resistenzgen; Luciferase= Luciferasegen (*Photinus pyralis*); SV40 Promoter= minimaler *Simian vacuolating virus 40* Promoter; TSDR= Treg specific demethylated region

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Ich habe mich nicht an anderer Stelle um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt- Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 15.04.2008

(Jennifer Freyer)

7.5 Publikationsliste und Kongressteilnahme

7.5.1 Publikationsliste

- Versuche zum Ersatz der kodierenden Region des Connexin 43 Gens durch diejenige des Connexin 26 Gens zu transgenen Mäusen. Bohnen, J; Diplomarbeit; Jun 2003
- Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cell. Floss *et al*;
PLOS Biology; Jan 2007
- Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.
Lahl *et al*; JEM; Jan 2007
- Replacement of Connexin43 by Connexin26 in transgenic mice leads to gonadal dysfunction.
Winterhagen *et al*; BMC Developmental Biology; Apr 2007
- DNA methylation controls *foxp3* gene expression. Polansky *et al*.; akzeptiert 03/08; European Journal of Immunology

7.5.2 Kongressteilnahme

- 06.09.2006-09.09.2006 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris, Frankreich
- 28.06.2007-29.06.2007 10th German Meeting on Th1/Th2 research, Marburg, Deutschland
- 05.09.2007-08.09.2007 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland
- 10.10.2007-12.10.2007 Autum School Epigeneticis, Berlin, Deutschland

Berlin, den 15.04.2008

(Jennifer Freyer)

7.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Alf Hamann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung, die Unterstützung und Begutachtung dieser Arbeit.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Dr. Jochen Hühn für die engagierte und kompetente Betreuung meiner Dissertation. Sein offenes Ohr zu jeder Zeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die stete Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik trugen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großes Dankeschön insbesondere an alle „Hafrauen und- männer“, jedoch auch an die gesamte Belegschaft des DRFZ für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen guten Tipps und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Tobias Freyer danke ich ganz besonders für seine persönliche Unterstützung, seine aufbauenden Worte, seine Geduld und sein Verständnis nicht nur während der Zeit der Dissertation.

Bei allen Bekannten und Freunden, besonders bei Manuela May und Marike ter Borg, möchte ich mich für die freundliche Ablenkung in sämtlichen Gemütslagen bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich von ganzem Herzen für ihre moralische Unterstützung, die ermutigenden Worte und das Vertrauen, das sie mir jederzeit entgegenbrachten.